

MIBE

Memorias del Instituto de Biología Experimental



Jornadas **IBE'2018**

VOLUMEN 9: 1-116 (2018)

ISSN 1316-7510

Depósito Legal pp 199802DF268

MIBE

Memorias del Instituto de Biología Experimental

**Facultad de Ciencias
Universidad Central de Venezuela**

Universidad Central de Venezuela

Cecilia García Arocha
Rectora

Nicolás Bianco
Vicerrector Académico

Bernardo Méndez
Vicerrector Administrativo

Amalio Belmonte
Secretario

Facultad de Ciencias

Ventura Echandía
Decano

Coordinadores

Académico: *Guillermina Alonso*

Postgrado: *Alejandro Crema*

Investigación: *Pío Arias*

Extensión: *Ernesto Fuenmayor*

Administrativo: *Santiago Gomez*

Directores

Escuela de Biología: *Fernando González*

Escuela de Computación: *Robinson Rivas*

Escuela de Física: *José Antonio López*

Escuela de Química: *Mary Lorena Araujo*

Escuela de Matemáticas: *Ángel Padilla*

Instituto de Biología Experimental: *Ernesto J. González R.*

Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos: *María Estela Matos S.*

Instituto de Ciencias de la Tierra: *Ramón Montero*

Instituto de Zoología Tropical: *Ana Bonilla*

Centro de Computación: *Antonio Machado*

Instituto de Biología Experimental

Ernesto J. González R.
Director

María Valentina Salas

Coordinadora del Centro de Biología Celular

Beatriz Vera

Coordinadora del Centro de Botánica Tropical

Antonio Gutiérrez

Coordinador del Postgrado en Biología Celular

Aníbal Castillo

Coordinador del Postgrado en Botánica

Representantes de los profesores:

Principales

Elizabeth Valdivieso

Concepción Hernández

Ana Herrera

María B. Raymúndez

Suplentes

Guillermina Alonso

Gustavo Benaim

Aníbal Castillo

Wilmer Tezara

Representante por el CDCH:

Antonio Machado (Principal)

Rafael A. Bello (Suplente)

Comisión Editora:

Ernesto J. González R.

Eva de García

Maira Oropeza

Alicia Cáceres

María Lorena Márquez

María Valentina Salas

MIBE

Memorias del Instituto de Biología Experimental

@Ediciones IBE

ISSN 1316-7510

Depósito Legal pp 199802DF268

Concepción y diseño editorial: Ernesto J. González R.

Fotografía de la portada: Luis Levin

Compaginación: Ernesto J. González R.

Impresión: IBE

Presentación

La realización de las **VIII Jornadas de Investigación IBE'2018** se enmarca dentro del 23^{er} aniversario de la creación del Instituto de Biología Experimental de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela, las cuales se realizaron a su vez bajo el marco de las Jornadas de Investigación y Extensión de la Facultad de Ciencias 2018, conmemorando el 60° aniversario de nuestra Facultad. Aunque de formalización relativamente reciente, el **IBE** es hoy una institución sólida, heredera de una amplia trayectoria científica basada en esfuerzos, iniciativas y vivencias de los fundadores de la Escuela de Ciencias, quienes lograron, al inicio del período democrático, su transformación en la primera Facultad de Ciencias del país. A la creación del **IBE** contribuyó en forma decisiva la generación de los pioneros que sentaron las bases para el desarrollo de la Biología Experimental en Venezuela.

La gradual transformación de laboratorios en grupos de investigación consolidados, entonces adscritos a los departamentos de la Escuela de Biología, abrió el camino para el establecimiento de los Centros de Botánica Tropical (CBT) y de Biología Celular (CBC) en 1985. La conversión de esta estructura organizativa transitoria en otra de rango administrativo y académico superior, fue lograda a través de un largo proceso de negociaciones que culminó cuando el Consejo Nacional de Universidades aprobó en forma definitiva la creación del Instituto de Biología Experimental, en su sesión ordinaria de fecha 24 de noviembre de 1994 (oficio CNU-SP-RI 338-94, publicado en la Gaceta Oficial Extraordinaria N° 4838, de fecha 18 de enero de 1995). Al instalarse la Asamblea de Investigadores del **IBE** elegimos democráticamente al Dr. Vidal Rodríguez Lemoine como el primer Director el 2 de junio de 1995, quien fuera ratificado por el Consejo de la Facultad de Ciencias y el Consejo Universitario. El acto académico que consagra el inicio formal de actividades del **IBE** lo realizamos el 8 de julio de 1995 en el Paraninfo de la Universidad Central de Venezuela. Al Dr. Rodríguez Lemoine le sucedieron en el cargo las doctoras Marcia Escala, Andrea Menéndez y Maira Oropeza, quienes mantuvieron el crecimiento del Instituto de Biología Experimental, dejando ahora en manos del suscrito este importante legado.

En el **IBE** hemos hecho modestas pero significativas contribuciones al conocimiento científico universal, participando muy activamente en la búsqueda de soluciones a muchos problemas que son de interés cercanos a nuestra realidad socio-económica. Esta afirmación tiene como base la orientación y alcances de la mayoría de los proyectos de investigación que se adelantan en nuestros laboratorios, así como en el número y calidad científica de los trabajos originales publicados en revistas especializadas, y en la activa participación de eventos científicos nacionales e internacionales. Detalles sobre cada uno de los aspectos relativos a la organización y composición académica de los laboratorios, sus proyectos de investigación y desarrollo, productividad científica y formación de recursos humanos, están recopilados en las ediciones bienales de la memoria descriptiva del Instituto, de las cuales hemos publicado consecutivamente las correspondientes a los bienios 1994-1995, 1996-1997, 1998-1999, 2000-2001, 2002-2003, 2004-2005, 2006-2007, 2008-2009, 2010-2011, 2012-2013 y 2014-2015. Este año publicaremos la *Memoria 2016-2017*, la duodécima de esta secuencia de actividades científicas por parte de todos nuestros investigadores, personal técnico y estudiantes de pre y postgrado. Así mismo, la actividad académica diaria es recogida y difundida a través de la edición **IBE Hoja Informativa**, boletín del cual hemos publicado hasta la fecha 317 números.

Desde los comienzos hemos dedicado parte de nuestro esfuerzo a proyectar y difundir las actividades de investigación que se realizan en cada uno de los laboratorios del **IBE**. En 1998 realizamos exitosamente las I Jornadas de Investigación, denominadas **Jornadas IBE'98**, dirigidas a dar a conocer, en toda su extensión, la trayectoria de los grupos de investigación integrados a los Centros de Biología Celular y de Botánica Tropical. En esa oportunidad adoptamos un formato basado en la presentación de carteles y la publicación simultánea de mini-revisiones sobre las líneas de investigación en desarrollo. A partir de ese momento iniciamos la publicación de la revista **MIBE, Memorias del Instituto de Biología Experimental** (ISSN

1316-7550, Depósito Legal pp 19980DF268), cuyo primer volumen dedicamos por entero a las **Jornadas IBE'98**.

Estamos convencidos que la iniciativa de publicar una revista con las características de las **Memorias del Instituto de Biología Experimental** ha sido un acierto. Con su creación no intentamos generar un medio para soslayar institucionalmente las dificultades que pudiéramos tener los investigadores para colocar trabajos originales en revistas del sistema internacional de publicaciones científicas. Nuestro objetivo primordial ha sido, y sigue siendo, la consolidación de un órgano de publicación, de alta calidad editorial y amplia difusión local, que sea capaz de servir de vínculo con la comunidad científica nacional, que nos permita tener presencia colectiva, divulgando – en conjunto – las actividades de investigación que se realizan en el Instituto. Así, el volumen 1, correspondiente al año 1998, lo dedicamos exclusivamente a las memorias de las **Primeras Jornadas de Investigación, Jornadas IBE'98**, realizadas en julio del mismo año. El volumen 2, correspondiente al año 1999, recoge las memorias del **Primer Simposio Venezolano de Etnobotánica**, realizado en julio de 1999, con la participación de investigadores del **IBE** y de todo el país. Los volúmenes 3, 4, 5, 6, 7 y 8 recogieron las mini-revisiones de las **Jornadas de Investigación IBE'2001, 2005, 2008, 2012, 2014 y 2016**, respectivamente. Estos volúmenes contienen revisiones actualizadas sobre temas específicos que reflejan la trayectoria de los laboratorios en el período transcurrido entre cada jornada y fueron publicadas en formato único con una extensión de cuatro páginas. Para cada volumen designamos un cuerpo de editores. Por su naturaleza y objetivos, la revista **MIBE** no ha estado abierta para la publicación de trabajos originales. A nuestro juicio, éstos deben difundirse a través de las publicaciones especializadas o multidisciplinarias de mayor impacto y difusión internacional. Desde el año 2016, la revista **MIBE** es publicada sólo en formato digital, contando para ello con el valioso aporte de la plataforma **SaberUCV**, lo cual nos ha permitido darle continuidad a este aporte de nuestro Instituto, a pesar de las restricciones que nos ha impuesto la disponibilidad presupuestaria.

Para la realización de las **VIII Jornadas de Investigación IBE'2018**, el Consejo Técnico decidió adoptar la misma estructura organizativa y los objetivos establecidos para las primeras jornadas. Para llevar a cabo nuestras jornadas, invitamos en marzo de 2018 a los profesores-investigadores y a los estudiantes de postgrado, y solicitamos la elaboración de revisiones actualizadas sobre el desarrollo de las líneas de investigación en los últimos cuatro años. A lo largo de este año 2018 recibimos 29 mini-revisiones, representativas de los 30 laboratorios adscritos al CBC y al CBT. Luego de cumplidos los requerimientos editoriales, las revisiones fueron incorporadas en el presente volumen de las **Memorias del Instituto de Biología Experimental (MIBE 9: 1-116. 2018)**. Al igual que en años anteriores, su contenido revela la presencia de una amplia variedad de temas de investigación con variados niveles de desarrollo. Encontramos líneas de investigación con más de veinte años de vida ininterrumpida y, en consecuencia, con una alta productividad. En otras áreas de reciente implantación encontramos avances importantes. Es muy apreciable el uso cada vez más generalizado de métodos y técnicas derivadas de la biología molecular. Pero es todavía más relevante la marcada y beneficiosa tendencia a establecer vínculos reales de cooperación entre los laboratorios y las disciplinas científicas que en ellos se desarrollan, y entre éstos y los de otras instituciones nacionales o del exterior. En cada uno de los proyectos representados en las memorias se reconoce la participación tanto de colaboradores internos como externos. Queda así plasmada la participación de un universo formado por 94 investigadores, colaboradores, contratados, estudiantes de pre y postgrado y técnicos vinculados a proyectos realizados en el **IBE**.

Por último, agradecemos a los miembros del Consejo Técnico, a la comisión que actuó como asesora a la edición de este volumen, al personal secretarial de la Dirección y, sobre todo, a los investigadores que de nuevo se sometieron a las exigencias y rigores del formato, y dedicaron tiempo para entregar los manuscritos. Esta experiencia servirá para ponderar y revisar los objetivos y alcances de los próximos volúmenes, y para mejorar su calidad editorial.

Ernesto José González Rivas

CONTENIDO

Caracterización <i>in silico</i> de proteasas presentes en el exoproteoma de <i>Leishmania mexicana</i> LUCINDA TAVARES, DANIELA PLASENCIA, PEDRO J. ROMERO Y MARÍA CAROLINA PÉREZ-GORDONES	1
Caracterización bioquímica y molecular del dominio de unión de la Calmodulina en la Ca²⁺-ATPasa de membrana plasmática de <i>Trypanosoma equiperdum</i> JOSÉ RUBÉN RAMÍREZ-IGLESIAS, GUSTAVO BENAİM, ALFREDO MIJARES, MARTA MENDOZA, PEDRO ROMERO Y MARÍA CAROLINA PÉREZ-GORDONES	5
El mecanismo de acción de la miltefosina sobre <i>Leishmania donovani</i> implica el deterioro de la función de los acidocalcisomas y la activación del canal de Ca²⁺ de la membrana plasmática dependiente de esfingosina GUSTAVO BENAİM, ANDREA PINTO MARTINEZ, JESSICA RODRIGUEZ, VANESSA HERNANDEZ Y NATHALIA MARTINEZ	9
Efecto de un derivado del benzofurano basado en la estructura de la amiodarona sobre <i>Trypanosoma cruzi</i> y <i>Leishmania donovani</i> NATHALIA MARTÍNEZ, ANDREA PINTO, JESSICA RODRÍGUEZ Y GUSTAVO BENAİM	13
Autofagia: mecanismo de sobrevivencia y/o muerte celular FRANCEHULI DAGGER BOYER	17
Actividad antimicrobiana de <i>Hibiscus sabdariffa</i> sobre <i>Escherichia coli</i>, <i>Klebsiella pneumoniae</i> y <i>Serratia marcescens</i> BEATRIZ ALVEZ, PAOLA MARTÍNEZ Y FABIOLA DUARTE	21
Cordón umbilical humano como fuente de células madre en la bioingeniería tisular ELIZABETH MERENTES, SILVIA SELVITELLA, ANNA SANCHEZ Y MARÍA LORENA MÁRQUEZ	25
Efecto de la combinación del 4-metilpiridilquinolina y N-acetil <i>strychnosplendine</i> sobre células de cáncer de páncreas humanos (PANC-1): Estudio “<i>in silico</i>” y modelaje molecular FELIPE SOJO, FRANCISCO ARVELO, ALÍRICA I. SUÁREZ, VLADIMIR V. KOUZNETSOV, MAYRA ROBLES-CASTELLANOS, FERNANDO A. ROJAS-RUIZ, ANGEL ROMERO Y CARLOS CIANEGHEROTTI	29
Estudio del efecto de compuestos naturales y sintéticos con actividad anti-tumoral sobre las corrientes de K⁺ en líneas celulares de cáncer de mama CHRISTIAN CALDERÓN, FELIPE SOJO, ANGEL ROMERO, FRANCISCO ARVELO, FERNANDO GONZÁLEZ Y ANTONIO GUTIERREZ	33
Marcadores moleculares en <i>Kinetoplastida</i>: Variabilidad genética de <i>Triatoma maculata</i> (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae), vector del <i>Trypanosoma cruzi</i>, en áreas endémicas de Venezuela ROBERTO GARCÍA-ALZATE, DAISY LOZANO-ARIAS, RAFAEL MATÍAS REYES-LUGO, ANTONIO MOROCOIMA, LEIDI HERRERA Y ALEXIS MENDOZA-LEÓN	37
Perspectivas para la formación de postgrado en Biología Aplicada al Diagnóstico de enfermedades causadas por microorganismos PALMIRA GUEVARA, JAHELI FUENMAYOR Y LUZ THOMAS	41
Invasión de la mucosa bucal por <i>Trypanosoma cruzi</i> en la infección experimental oral con el aislado venezolano AM-16 JENIREE SAGASTI, CRISTINA SANOJA, LORENA MÁRQUEZ Y GILBERTO PAYARES	45

Zooplankton del embalse Petaquire (Edo. Vargas): Composición, abundancia y biomasa OSCAR ZAPATA, ERNESTO J. GONZÁLEZ RIVAS, JOSÉ V. MONTOYA, MARY PÉREZ Y MARÍA D. MENDOZA	49
Conducta de aproximación las hembras de <i>Physalaemus pustulosus</i> y <i>Physalaemus fischeri</i> (Leptodactylidae) durante la fonotaxis en ambientes acústicos de complejidad creciente ZAIDA TÁRANO MIRANDA	53
Propagación de bananos manzano (<i>Musa</i> AAB) y CIEN BTA-03 (<i>Musa</i> AAAA), mediante cultivos <i>in vitro</i> de ápices de yemas florales masculinas EVA DE GARCÍA, TERESA E. VARGAS, AMALIA BRITO Y LUIS HERMOSO	57
Aplicación de biotécnicas al cultivo de plantas de interés comercial TERESA E. VARGAS, MICHELLE AMERUOSO L., YANETZA LINARES, MARIANA ANDRADE, LUIS HERMOSO, HÉCTOR BLANCO Y EVA DE GARCÍA	61
Importancia del explante inicial para la inducción de embriogénesis somática en café <i>Coffea arabica</i> L. ANDREA MENÉNDEZ-YUFFÁ Y LUIS HERMOSO-GALLARDO	65
Aislamiento e identificación de bacterias patógenas de papa (<i>Solanum tuberosum</i> L.) ANA KARINA MARCANO, GÉNESIS APOLINARIO, YURANI YÉPEZ Y MAIRA OROPEZA	69
El cultivo <i>in vitro</i> como herramienta para la producción de semillas certificadas y establecimiento de bancos de germoplasmas YAYFRÉ REINA, TERESA EDITH VARGAS, LUIS HERMOSO, MICHELLE AMERUOSO, ANTONIO INDRIAGO, MAIRA OROPEZA	73
Dispersión de semillas de <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> Lam. (Rutaceae) en un remanente de bosque en los Andes Venezolanos NELSON RAMÍREZ Y HERBERT BRICEÑO	77
Una visión comparativa entre la agricultura de altos insumos y bajos insumos y su efecto sobre los Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA) y algunos parámetros bioquímicos y microbiológicos del suelo ALICIA CÁCERES, MAOLY MÁRQUEZ, FRANK ZARRAGA, ISMAEL HERNÁNDEZ, KARLA CÁCERES-MAGO Y DAVID SIERRAALTA	81
El arbusto <i>Hypericum laricifolium</i> Juss como ingeniero ecosistémico en un gradiente altitudinal en el páramo desértico: Variaciones microambientales y asociaciones espaciales con otras especies de la comunidad KARLA CÁCERES-MAGO, ALICIA CÁCERES Y LUIS DANIEL LLAMBÍ	85
Intercambio gaseoso en café y su respuesta al déficit hídrico WILMER TEZARA, DANIEL LOYAGA, PATRICIA MENDOZA, MILTON BOLAÑOS Y VICTOR REYNEL	89
Intercambio gaseoso y actividad fotoquímica en clones de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.) cultivados en el sistema agroforestal del INIA-Miranda HÉCTOR ALEXANDER BLANCO-FLORES, ELEINIS ÁVILA-LOVERA, OLGA MOVIL Y WILMER TEZARA	93
Morfología y Anatomía Foliar. Aplicación e Importancia en Bromelias del Arboretum-IBE MARCIA ESCALA Y LUIS HERMOSO	97

Biosistemática vegetal en la caracterización y preservación de la biodiversidad MARÍA B. RAYMÚNDEZ, ANGIE SILVA, ALCIDES MONDRAGÓN Y REINA GONTO	101
Estudio de la arboricultura urbana perteneciente a la parroquia El Recreo, Municipio Libertador (Distrito Capital) ANIBAL CASTILLO Y REINA BELANDRIA	105
Ficoflora de macroalgas bénticas marinas venezolanas. Estatus actual SANTIAGO GÓMEZ ACEVEDO Y YUSNEYI CARBALLO BARRERA	109
Macrofitas marinas de la costa venezolana, borde sur del Caribe BEATRIZ E. VERA, CELIA MORENO, SHEILA MARQUES PAULS, DILSIA CANELÓN Y REYNALDO COMPAGNONE	113

Caracterización *in silico* de proteasas presentes en el exoproteoma de *Leishmania mexicana*

LUCINDA TAVARES¹, DANIELA PLASENCIA², PEDRO J. ROMERO² Y
MARÍA CAROLINA PÉREZ-GORDONES²

¹Laboratorio de Proteómica, Instituto De Estudios Científico y Tecnológicos IDECYT, Universidad Simón Rodríguez. ²Laboratorio de Fisiología de Membranas, Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. Calle Suapure, Colinas de Bello Monte, Caracas-Venezuela
Correo: mariac.perez@ciens.ucv.ve

Las diferentes especies de *Leishmania* garantizan su supervivencia y transmisión mediante la liberación de factores proteicos que interactúan y modifican los ambientes intracelulares de sus células dianas. A estas proteínas exportadas al exterior celular, se les conoce como exoproteoma. Actualmente, es poca la información sobre las proteasas presentes en el exoproteoma que pudieran estar vinculadas con los procesos de infección y mantenimiento del parásito. Trabajos previos nos han permitido evidenciar la presencia de 10 proteasas en el exoproteoma de promastigotes de *Leishmania mexicana*, de las cuales sólo a 3 se les conocen sus funciones biológicas. Por tal motivo, nuestro objetivo es la caracterización *in silico* de estas proteasas, con el fin de determinar su potencial como blanco quimioterapéutico o de uso diagnóstico. Para ello, primero comparamos el porcentaje de homología de las proteasas de interés, previamente identificadas en la base de datos MEROPS, con proteínas presentes en el proteoma de *Homo sapiens*. Posteriormente, con la ayuda de los servidores Compute pI/Mwtool, BcPredPredictions, PredictProtein y Phyre2 analizamos las características topológicas y estructurales de las proteínas. Nuestros resultados identificaron a dos metalo y una cisteín-proteasas, como proteínas antigénicas con potencialidad para ser empleadas como blancos para el diseño de drogas antileishmanicidas.

Introducción

Tripanosomatidios del género *Leishmania* sp., son los agentes causales de las diferentes manifestaciones clínicas conocidas como leishmaniasis (8). La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima, a nivel mundial, que 12 millones de personas padecen de estas enfermedades, con una incidencia anual de 2 millones de casos nuevos (17). A pesar de múltiples esfuerzos para el control de estas enfermedades, aún no se cuenta con una vacuna efectiva. Los fármacos de primera y segunda línea son muy costosos, inducen efectos colaterales en los pacientes y se ha reportado resistencia a éstos por parte de los parásitos (13). Por tal motivo, una comprensión detallada de todos los aspectos involucrados en los procesos biológicos del parásito, permitirá formular nuevas estrategias antiparasitarias (13).

Las diferentes formas morfológicas presentes en el ciclo de vida de *Leishmania*, promastigote y amastigote, representan una adaptación del parásito a las diferentes condiciones ambientales dentro de sus dos hospedadores. Es decir, los parásitos requieren de factores proteicos que interactúen y modifiquen los ambientes intracelulares del hospedador (13). Estas proteínas extracelulares, conocidas como exoproteoma y garantes del proceso infectivo, desempeñan un papel activo en las primeras interacciones huésped-parásito (4).

Importancia de las proteasas en el exoproteoma de *Leishmania* en el proceso de interacción parásito-hospedador

La supervivencia de *Leishmania* sp. durante su ciclo de vida, se debe a las diferentes estrategias con que éstas cuentan para contrarrestar los mecanismos de defensa de las células hospederas (4). Actualmente, hay evidencias que, tanto los promastigotes como los amastigotes, son capaces de exportar al citoplasma de la célula huésped proteasas que modulan directamente las diferentes rutas de señalización del hospedador (10). Dentro de las proteasas identificadas en los exoproteomas de *Leishmania donovani infantum* (13,15), se destacan: 1) La Leishmaniosina o GP63 (19), 2) La cisteín-proteasa B (CP-B) (6), y 3) Una serín-proteasa (2,3), todas vinculadas a procesos de virulencia, invasión celular y la interacción parásito-hospedador.

Dada la importancia de las enzimas proteolíticas en los procesos adaptativos de supervivencia de *Leishmania* sp. (10), las proteasas exportadas se proponen como responsables del mantenimiento del parásito en la célula hospedera. Por tal motivo, nuestro interés es profundizar en la identificación y caracterización de proteasas presentes en el exoproteoma de promastigotes y amastigotes de *Leishmania mexicana*, con el propósito de establecer diferencias entre éstas e identificar cuáles pudieran estar relacionadas con el desarrollo y mantenimiento del parásito.

Proteasas presentes en el exoproteoma de Promastigotes de Leishmania mexicana

Trabajos previos realizados en el laboratorio, nos permitieron identificar por espectrometría de masa, 124 proteínas del exoproteoma de promastigotes de *L. mexicana* (11). Estas proteínas fueron clasificadas en base a su función biológica con la ayuda del servidor “Gene Ontology Consortium/ PANTHER” (9). Los resultados indicaron que las proteasas ocupan la cuarta posición en abundancia, lo que representa un 12%, constituido por 10 proteasas, pertenecientes a las familias de las metalo y cisteín-proteasas. Dentro de estas 10 proteasas, se identificaron las 3 más estudiadas: GP63, la Cisteínpeptidasa B y la Oligopeptidasa b (16). Sin embargo, las funciones biológicas de las 7 proteasas restantes no lograron ser identificadas por el servidor utilizado. Por tal motivo, el objetivo de este trabajo fue el de caracterizar *in silico* a estas proteasas para medir su potencialidad como blancos quimioterapéuticos y/o diagnóstico.

Caracterización in silico de proteasas presentes en el exoproteoma de Leishmania mexicana

Las 7 proteasas de interés, fueron primeramente evaluadas utilizando la base de datos MEROPS (12), con el fin de corroborar la identificación obtenida por el servidor “Gene Ontology” y clasificarlas entre las diferentes familias y clanes de proteasas. Esta base de datos también permitió conocer algunos de los procesos biológicos donde están involucradas estas enzimas, así como posibles inhibidores de las mismas. Como se puede observar en la **Tabla 1**, el servidor MEROPS identificó a cada una de las proteasas, con un 100% de homología, con proteínas de *L. mexicana*. Cinco de estas proteínas fueron clasificadas como metalo-proteasas (M) y una como cisteín-proteasas (C). Cabe destacar, que la proteasametil-hidroximetiltiazole (GI: 401425479), previamente identificada por el servidor “Gene Ontology”, como una putativa cisteín-proteasa, no pudo ser asignada a ninguna de las familias de proteasas descritas en el servidor MEROPS, sugiriendo, que dicha enzima carece de dominios clásicos para las cisteín-proteasas de eucariotas superiores.

Posteriormente, evaluamos la homología de estas proteasas con proteínas presentes en el proteoma de *Homo sapiens* (taxid:9606) mediante un “Protein BLAST” usando la base de datos de NCBI. Por otra parte, también realizamos la búsqueda de dominios característicos utilizando el servidor PROSITE, para corroborar la función biológica de estas proteasas (14). En general, en la **Tabla 2** se puede observar

que las 7 proteasas de interés presentan un bajo porcentaje de homología con proteínas humanas.

Tabla 1. Identificación de proteasas del exoproteoma de *Leishmania mexicana* en la base de datos MEROPS.

Proteasa GI	Identificación MEROPS	Calificación MEROPS	Proceso Biológico	Inhibidor
GI:401423944	100% Oligopeptidasa Putativa thimet <i>L. mexicana</i>	Metalopeptidasa, Familia M3 Clan MA(E)	GO: 0006508: Proteólisis GO: 0004222: Actividad metalo endo-peptidasa	Desconocido
GI:401424277	100% Putativa Cistein proteinasa tipo Calpaina <i>L. mexicana</i>	Cistein peptidasa Familia C2 Clan CA	GO: 000658: Proteólisis GO: 0004198: Cisteinpeptidasa dep. de Ca ²⁺ Actividad tipo endo-peptidasa	E-64 Leupeptina
GI:401425479	100% Putativa metil-hidroximetil tiazole monofosfato <i>L. mexicana</i>	No hay peptidasas homologas en MEROPS	Desconocido	Desconocido
GI:401426292	100% Putativa N-acyl-amidohidrolasa <i>L. mexicana</i>	Metalopeptidasa Familia M20	GO: 0008152: Procesos metabólicos GO: 0016787: Actividad hidrolasa	Bestatina EDTA Fenantrolina
GI:401414348	100% Putativa Peptidil dipeptidasa 1 <i>L. mexicana</i>	Metalopeptidasa Familia Peptidil-dipeptidasa M3A-DCP	GO: 0006508: Proteólisis GO: 0004222: Actividad metalopeptidasa	Desconocido
GI:401414979	100% Peptidil dipeptidasa 3 <i>L. mexicana</i>	Metalopeptidasa Familia Peptidil-dipeptidasa M3A	GO: 0006508: Proteólisis GO: 0008239: Actividad dipeptidil	Desconocido
GI:401415676	100% Aminopeptidasa 1 <i>Leishmania mexicana</i>	Metalopeptidasa Alanina aminopeptidasa Familia M1	GO: 0006508 proteólisis GO: 0008237 Actividad metalopeptidasa	Bestatina Amastatina EDTA Fenantrolina

GI: número de identificación del gen. GO: número de identificación “GeneOntology” de proceso biológico (12).

Tabla 2. Homología de proteasas del exoproteoma de *Leishmania mexicana* en con proteínas humanas.

Proteasa GI	% Homología Con Proteínas Humanas	Dominios característicos
GI:401423944 Metaloproteasa,	34% Oligopeptidasa 1Thimet	471-480 TFFFEFGHAI Dominio de unión a zinc
GI:401424277 Cisteinproteasa Tipo -Calpaina	24% Calpaina 2	1-303 Sitio catalítico 648-918 Sitio catalítico 3713-3989 Sitio catalítico
GI:401425479 Cisteinproteasa	39% M26l Dj-1	No reconoce dominios
GI:401426292 Metaloproteasa	33% Hidrolasa nc	No reconoce dominios
GI:401414348 Metaloproteasa	36% Peptidasa M3 28% Oligopeptidasa 1Thimet 28% ProteínaTHOP1	463-472 TLFHEFGHGL Dominio de unión a zinc
GI:401414979 Metaloproteasa	43% Dipeptidil peptidasa 3	No reconoce dominios
GI:401415676 Metaloproteasa	29% Aminopeptidasa	297-306 LICHEVSHNW Dominio de unión de zinc

% Homología con proteínas de *Homo sapiens* (taxid:9606) obtenido por “Protein BLAST” (NCBI). Búsqueda de Dominios utilizando el servidor PROSITE (14).

Con respecto a la búsqueda de dominio, el servidor PROSITE no pudo reconocer dominios característicos de proteasas en las proteínas: GI:401425479, GI:401426292 y GI:401414979, a pesar de que estas previamente habían sido caracterizadas como posibles cisteín y metalo-proteasa, respectivamente, por el servidor “Gene

Ontology”. La baja homología de estas proteasas con proteínas humanas aunado a la falta de un dominio clásico de cisteín y/o metalo-proteasa, sugiere que dichas proteínas son muy diferentes a las reportadas en eucariotas superiores y por ende, pueden ser consideradas como candidatas a blancos de drogas y/o diagnóstico.

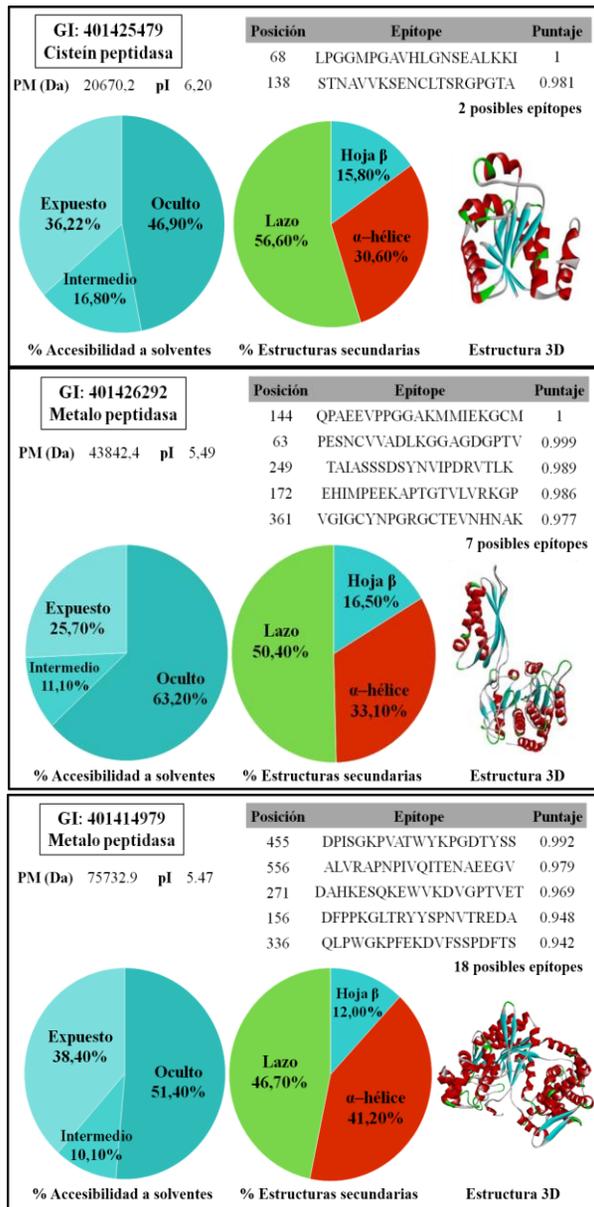


Fig. 1. Caracterización topológica y estructural de proteasas presentes en el exoproteoma de *Leishmania mexicana*. La figura muestra los resultados de los servidores: A) Compute pI/Mwtool: para el cálculo teórico de peso molecular (PM) y Punto Isoeléctrico (PI) (1). B) BcPredPredictions: para la predicción de epítopes lineales de células B. Los valores puntaje de probabilidad van de 0 a 1, siendo 1 el valor de más alta probabilidad (5). C) PredictProtein: para la predicción de estructuras secundarias, así como la accesibilidad del péptido a solventes (18), y D) Phyre2 para el modelaje tridimensional de la proteína (7).

Para profundizar en el estudio de estas 3 proteasas, carentes de dominios clásicos de proteasas, procedimos a caracterizarlas topológica y estructuralmente, con el fin de buscar posibles regiones expuestas que pudieran tener propiedades antigénicas. Para ello, utilizamos el servidor “BcPredPredictions”, el cual predice epítopes lineales para células B (5).

Como se puede observar en la **Fig. 1**, las proteasas estudiadas presentan una gran proporción de residuos aminoacídicos expuestos o con gran accesibilidad a solventes. Esta condición aumenta la probabilidad de que estas proteínas posean dominios potencialmente antigénicos o inmunogénicos, hecho que se pudo corroborar con el servidor “BcPredPredictions” (**Fig. 1**). Las tres proteínas estudiadas presentan regiones o dominios con alta probabilidad de ser epítopes lineales para células B. Por otra parte, en la **Fig. 1**, se puede observar la estructura 3D de los péptidos predicha por el servidor Phyre2 (7). Las estructuras obtenidas son acordes con los porcentajes de estructura secundaria previstos con el servidor PredictProtein (18).

En conclusión, estos resultados permiten sugerir a las proteasas GI:401425479, GI:401426292 y GI:401414979 en base a sus características, como los mejores candidatos a blancos quimioterapéuticos, antigénicos e inmunogénicos. Sin embargo, para ello, éstas deben ser estudiadas a mayor profundidad a fin de comprobar su importancia en el mantenimiento y sobrevivencia del parásito.

Referencias

1. Altschul, S., Gish, W., Miller, W., Myers, E. y Lipman, D. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, **215**: 403–410.
2. Choudhury, R., Bhaumik, S., De, T. y Chakraborti, T. (2009). Identification, purification, and characterization of a secretory serine protease in an Indian strain of *Leishmania donovani*. *Mol. Cell. Biochem.*, **320**: 1–14.
3. Choudhury, R., Das, P., Bhaumik, S.K., De, T. y Chakraborti, T. (2010). In situ immunolocalization and stage-dependent expression of a secretory serine protease in *Leishmania donovani* and its role as a vaccine candidate. *Clin. Vaccine Immunol.*, **17**: 660–667.
4. Corrales, R., Sereno, D. y Mathieu-Daude, F. (2010). Deciphering the *Leishmania* exoproteome: what we know and what we can learn. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **58**: 27–38.
5. El-Manzalawy, Y., Dobbs, D. y Honavar, V. (2008). Predicting linear B-cell epitopes using string kernels. *J. Mol. Recognit.*, **21**: 243–255.

6. **Hassani, K., Antoniak, E., Jardim, A. y Olivier, M.** (2011). Temperature-Induced protein secretion by *Leishmania mexicana* modulates macrophage signalling and function. **Plos One**, **6**: 1–10.
7. **Kelley, L.** (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. **Nat. Protoc.**, **10**: 845–858.
8. **McMahon-Pratt, D. y Alexander, J.** (2004). Does the *Leishmania major* paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniases or the visceral disease? **Immunol. Rev.**, **201**: 206–224.
9. **Mi, H., Muruganujan, A., Casagrande, J. y Thomas, P.** (2013). Large-scale gene function analysis with the PANTHER classification system. **Nat. Protoc.**, **8**: 1551–1566.
10. **Mottram, J., Coombs, G. y Alexander, J.** (2004). Cysteine peptidases as virulence factors of *Leishmania*. **Curr. Opin. Microbiol.**, **7**: 375–381.
11. **Pérez-Gordones, M., Méndez, M., Vonasek, E., Romero, P. y Hernández-Chinea, C.** (2016). Proteasas presentes en el exoproteoma de *Leishmania mexicana*. **MIBE**, **8**: 9–12.
12. **Rawlings, N., Barrett, A., Thomas, P., Huang, X., Bateman, A. y Finn, R.** (2018). The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. **Nucleic Acids Res.**, **46**: D624–D632.
13. **Santarém, N., Racine, G., Silvestre, R. Cordeiro-da-Silva, A y Ouellette, M.** (2013). Exoproteome dynamics in *Leishmania infantum*. **J Proteomics**, **84**: 106–118.
14. **Sigrist, C., de Castro, E., Cerutti, L., Cuche, B., Hulo, N., Bridge, A., Bougueleret, L. y Xenarios, I.** (2013). New and continuing developments at PROSITE. **Nucleic Acids Res.**, **41**: D344–D347.
15. **Silverman, M., Chan, S., Robinson, D., Dwyer, D., Nandan, D., Foster, L. y Reiner, N.** (2008). Proteomic analysis of the secretome of *Leishmania donovani*. **Genome Biol.**, **9**: R35 1–21.
16. **Silvia-Almedia, M., Santini, A., Lopes, M. y Roberto, C.** (2012). Proteinases as virulence factors in *Leishmania* spp. Infection in mammals. **Parasite Vectors**, **5**: 160–170.
17. **Stuart, K., Brun, R. y Croft, S.** (2008). Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. **J. Clin. Invest.**, **118**: 1301–1310.
18. **Yachdav, G., Kloppmann, E., Kajan, L., Hecht, M., Goldberg, T., Hamp, T., Hönigschmid, P., Schafferhans, A., Roos, M., Bernhofer, M., y colaboradores.** (2014). PredictProtein—an open resource for online prediction of protein structural and functional features. **Nucleic Acids Res.**, **42**(Web Server issue): W337–W343.
19. **Yao, C.** (2010). Major surface protease of trypanosomatids: one size fits all? **Infect. Immun.**, **78**: 22–31.

Caracterización bioquímica y molecular del dominio de unión de la Calmodulina en la Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática de *Trypanosoma equiperdum*

JOSÉ RUBÉN RAMÍREZ-IGLESIAS¹, GUSTAVO BENAÏM², ALFREDO MIJARES³, MARTA MENDOZA¹, PEDRO ROMERO⁴ Y MARÍA CAROLINA PÉREZ-GORDONES⁴

¹Laboratorio de Biología de Parásitos, Instituto de Estudios Científicos y Tecnológicos, Universidad Nacional Experimental Simón Rodríguez. ²Biociencias, Instituto de Estudios Avanzados. ³Laboratorio de Fisiología de Parásitos, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas IVIC. ⁴Laboratorio de Fisiología de Membranas, Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. Correo: mariac.perez@ciens.ucv.ve

La Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática (PMCA), es una enzima clave en la homeostasis intracelular de Ca^{2+} . Esta ha sido descrita en todos los eucariotas estudiados, presenta propiedades estructurales-funcionales que la diferencian de las demás ATPasa. Evidencias bioquímicas-inmunológicas han permitido identificar a la PMCA en diferentes Tripanosomatidios; éstas presentan características similares a las de mamíferos, entre ellas su modulación por calmodulina (CaM). Sin embargo, las secuencias reportadas carecen del dominio clásico de unión a CaM, generando una controversia sobre su posible interacción. Estudios previos, nos permitieron evidenciar en la membrana plasmática de *Trypanosoma equiperdum*, una proteína de 120 kDa con actividad Ca^{2+} -ATPasa, modulada por CaM, la cual también carece de un dominio clásico de unión a CaM. Sin embargo, análisis *in silico* nos permitieron proponer una secuencia de 28 residuos aminoacídicos, localizada en el extremo C-terminal como posible región de unión a CaM. En base a estos resultados, el objetivo del presente trabajo fue determinar, mediante estudios bioquímicos y moleculares, a esta región como la responsable de la interacción CaM-PMCA. Para ello, expresamos una proteína recombinante, contentiva de la región propuesta, así como péptidos sintéticos contentivos de motivos de unión a la proteína con la finalidad de evaluar su funcionalidad.

Introducción

La Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática (PMCA) es una enzima clave en la homeostasis intracelular de Ca^{2+} . Esta ha sido descrita en todas las células eucariotas superiores estudiadas, presentando propiedades estructurales y funcionales que la diferencian de las demás ATPasa (4). El principal modulador proteico de la PMCA es la CaM, proteína enlazadora de Ca^{2+} , altamente conservada y presente en todas las células eucariotas. Su estructura terciaria está constituida por dos regiones globulares en los extremos C y N-terminal, unidos por una larga α hélice flexible. La unión de Ca^{2+} a esta proteína induce cambios conformacionales que exponen en la proteína dominios hidrofóbicos que le permite unirse a sus proteínas dianas (11).

Generalmente, la CaM se une a la PMCA en el extremo C-terminal de la enzima, en un dominio que se caracteriza por presentar una estructura helicoidal anfipática de 20 residuos, la cual contiene aminoácidos cargados positivamente intercalados entre residuos hidrofóbicos (12). Los dos lóbulos de esta proteína se envuelven alrededor de este motivo, encerrándolo en un canal hidrofóbico (12). La región CaM que conecta ambos lóbulos actúa como una bisagra flexible, conformación que le permite

interaccionar con residuos aminoacídicos hidrofóbicos o anclas separados por un número variable de residuos. En general, no hay una secuencia consenso definida de los sitios de unión a CaM. La gran flexibilidad estructural de CaM, le permite unirse a una amplia gama de motivos conocidos como: 1-10, 1-14, 1-16 y 1-18, entre otros, donde los números referidos representan la posición de las anclas y la cantidad de residuos entre éstas (11).

Evidencias de la presencia de Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática en Tripanosomatidios

Estrategias bioquímicas e inmunológicas han permitido evidenciar proteínas tipo PMCA en Tripanosomatidios (1,5). Sin embargo, pese a las similitudes estructurales y funcionales, a nivel molecular se ha descrito la ausencia de secuencias clásicas de unión a CaM en las PMCA de estos parásitos (7), sugiriendo la posibilidad de la existencia de dominios de unión no clásico o formas alternativas de modulación de esta proteína sobre las PMCA (5,8). La mayoría de los trabajos que estudian el dominio de unión a CaM en la PMCA se han realizado empleando la isoforma PMCA4b de humanos, siendo escasos los estudios de unión de otras especies incluyendo a los Tripanosomatidios.

Por lo tanto, surge la necesidad de continuar con estudios que permitan profundizar sobre los mecanismos involucrados en la regulación del Ca^{2+} en estos parásitos.

*Evidencias de la presencia de una Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática en *T. equiperdum**

Trabajos previos, empleando fracciones enriquecidas de membrana plasmática de *T. equiperdum* (FMPTe) permitieron: 1) Identificar una banda de 120 kDa utilizando el anticuerpo monoclonal 5F10, el cual reconoce una secuencia conservada en las isoformas de PMCA1-4 de humanos. 2) Determinar la presencia de una actividad ATPasa dependiente de Ca^{2+} y modulada por CaM, empleando el método de Fiske y Subarow (6), obteniéndose valores V_{max} y K_m en ausencia y presencia de CaM bovina de 8,2 nmoles Pi/mg proteína x min y 0,35 μM y de 13,24 nmoles Pi/mg proteína x min y 0,18 μM , respectivamente. Por otra parte, cabe destacar que en presencia de CaM de *Trypanosoma cruzi* (CaMTc), se observó un aumento significativo de la V_{max} y disminución del K_m con respecto a la modulación inducida por la bovina (V_{max} de 15,47 nmoles Pi/mg proteína x min, K_m 0,17 μM). 3) La purificación de una proteína de 120 kDa, a partir de la FMPTe mediante una cromatografía de afinidad empleando una columna de CaM-sefarosa. 4) El marcaje con CaM-Biotinilada de una banda de igual masa molecular en la FMPTe (10).

Por otra parte, el elevado porcentaje de identidad (>95 %) entre las secuencias de las PMCA de los Tripanosomatidios del subgénero *Trypanozoon*, permitió diseñar cebadores sobre la secuencia de una putativa PMCA de *T. brucei*, los cuales amplificaron en *T. equiperdum* una secuencia cuya traducción aminoacídica predice una proteína de 1.080 residuos, con un peso molecular teórico de 118,9 kDa. Un análisis *in silico* permitió determinar la presencia de los dominios característicos de las Ca^{2+} -ATPasa sobre la secuencia obtenida, la presencia de 10 dominios transmembrana y de los dominios clásicos de activación (A), fosforilación (P) y de unión a nucleótidos (N), así como los dominios de unión a Ca^{2+} , permitiendo con ello identificar una Ca^{2+} -ATPasa tipo PMCA en *T. equiperdum* (TePMCA) (10).

El posterior análisis del dominio C-terminal de esta secuencia con el del servidor Calmodulation Database Meta-Analysis Target Site Predictor (CDMAP) (9), nos permitió sugerir una región de 28 residuos aminoacídicos con una alta densidad de posibles motivos de unión a CaM, específicamente

entre los residuos R₉₁₃-D₁₀₆₂ de la enzima. Por lo tanto y con base a las evidencias descritas, el objetivo de este estudio fue determinar la región de unión a CaM en la TePMCA.

Obtención del dominio C-terminal recombinante de la TePMCA (P14) y la evaluación mediante ensayos de competencia de su capacidad de interacción con CaM

La identificación de una región de unión a CaM por el servidor CDMAP en la TePMCA, condujo al diseño de péptidos sintéticos, cuyas secuencias albergan los motivos potenciales de unión a ésta predichos *in silico*, así como a la expresión de la proteína recombinante P14, la cual contiene la región en estudio. La P14 y los péptidos PEP1 y PEP3, se utilizaron en pruebas bioquímicas de competencia para evaluar su capacidad de secuestro de CaM. Igualmente, con el propósito de estudiar la participación de los residuos anclas L, W y F, se diseñaron péptidos modificados, PEP2 y PEP4, en los cuales las anclas fueron sustituidas por el aminoácido polar S.

Tabla 1. Efecto de la P14 y los péptidos sintéticos sobre la estimulación por CaM de la actividad Ca^{2+} -ATPasa de la TePMCA.

[Inhibidor nM] + 190 nM CaMTc	Actividad Ca^{2+} -ATPasa (Pi/ mg proteína x min)				
	P14	PEP1	PEP2	PEP3	PEP4
0	42,74 ± 2,6	42,61 ± 2,53	40,33 ± 3,2	41,34 ± 3,2	42,20 ± 2,72
100		42,73 ± 2,94		39,2 ± 2,93	
150		41,1 ± 2,91		35,73 ± 2,73	
200	29,4 ± 2,7	39,63 ± 2,83	40,34 ± 3	31,3 ± 2,79	41,61 ± 2,92
300		37,7 ± 2,9		27,2 ± 2,8	
400		35,21 ± 3		25,6 ± 2,94	
800	20 ± 2,2	31,1 ± 2,77	42,46 ± 2,84	19,37 ± 2,68	40,12 ± 2,91
Sin CaMTc, actividad Ca^{2+} -ATPasa basal 19,73 ± 2,23					

Se muestran los valores promedio de 6 experimentos independientes para cada condición, junto con la desviación estándar asociada.

La capacidad de secuestro de CaMTc por P14, fue evaluada en ensayos de competencia empleando diferentes concentraciones de la proteína recombinante. Este ensayo fue llevado a cabo empleando el método de determinación de Pi descrito por Cariani y col. (3). Los resultados se muestran en la **Tabla 1**, donde se observa una disminución de la estimulación de la actividad por CaMTc dependiente de la concentración de P14. A una concentración de 200 nM de P14, la actividad se reduce a 29,9nmoles Pi/mg proteína x min, y al incrementarla a 800 nM, se elimina por completo la estimulación por CaMTc, retornando al nivel basal de la enzima. Es importante señalar que la presencia de P14 no afecta la actividad basal de la bomba,

indicando su efecto específico sobre la CaMTc. Estos resultados confirman la localización del dominio de unión a la proteína en la región C-terminal de la TePMCA, representada por P14.

En la **Tabla 1**, también se puede observar el efecto de los diferentes péptidos sintéticos sobre la estimulación de la PMCA por CaMTc. PEP3 inhibe la estimulación por CaMTc a bajas concentraciones (150nM), reduciendo significativamente los valores de actividad de 42 a 35,73 nmoles Pi/mg proteína x min. La capacidad de inhibición de PEP3 se incrementa a medida que aumenta su concentración, presentando un IC_{50} 213,6 nM. Por su parte, PEP1 genera una menor inhibición, con un IC_{50} de 798,2 nM. En cambio, los péptidos modificados, PEP2 y PEP4, no afectaron la actividad basal de la enzima, indicando la importancia de los residuos anclas hidrofóbicos en la interacción PMCA-CaM.

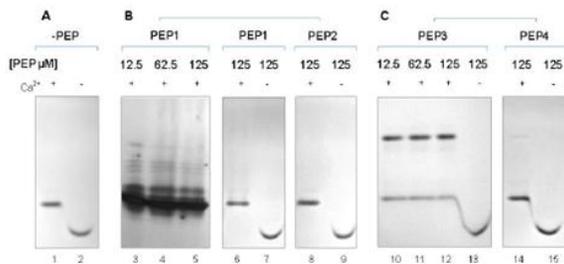


Fig. 1. Análisis de la interacción CaM-péptidos sintéticos mediante electroforesis nativa. Incubación de CaM (12,5 µM) en presencia (5 mM) o ausencia (EGTA 5 mM) de Ca^{2+} , con diferentes concentraciones (12,5 – 125 µM) de los péptidos sintéticos. Paneles: A) CaM sin péptidos. B) CaM + PEP1/2. C) CaM + PEP3/4. Revelados mediante tinción con: 3-5) plata y 1, 2 y 6-15) azul de Coomassie.

Posteriormente, analizamos la interacción CaM-péptido por electroforesis en condiciones nativas. En el panel A de la **Fig. 1**, se puede observar la diferencia entre la movilidad electroforética de la proteína en presencia y ausencia de Ca^{2+} , siendo menor en ausencia de Ca^{2+} . En el panel B de la figura, se observa la interacción CaMTc-PEP1, bajo diferentes condiciones. La interacción se revela como múltiples bandas distribuidas a lo largo del carril, indicando la formación de complejos poco estables. En el caso del complejo CaMTc-PEP2, no se observan modificaciones en el patrón electroforético de la CaM, indicando la importancia de los residuos anclas en la interacción. Adicionalmente, en el panel C se observa una disminución en la migración de CaM producto de su interacción con PEP3, indicando la formación de complejos CaM-PEP3 estable. Nuevamente, este patrón de electroforesis cambia de forma drástica al modificar los residuos anclas en el caso de PEP4, donde solo se observa una banda difusa.

Análisis *in silico* de la interacción CaMTc con PEP3

Los ensayos de competencia y unión a CaM empleando péptidos sintéticos, permitieron delimitar el dominio de unión a CaM de la TePMCA a la secuencia representada por el PEP3, secuencia que cumple con todas las características clásicas para un dominio de unión a CaM, como son: carga neta positiva (+6), tendencia a formar una estructura helicoidal y la presencia de residuos hidrofílicos e hidrofóbicos distribuidos a lo largo de la estructura.

Para corroborar la interacción de CaM con TePMCA y estudiar la participación de residuos anclas, se realizó el acoplamiento CaMTc-PEP3 usando el servidor web CABS-DOCK (2). La **Fig. 2** muestra el acoplamiento CaMTc-PEP3, el cual presenta las típicas características de una estructura CaM-péptido, como son: una conformación globular, una unión antiparalela y una estructura helicoidal adoptada por el péptido, con las anclas aromáticas W_{1039} , L_{1042} , F_{1056} y W_{1060} completamente inmersas en los lóbulos del receptor C y N, respectivamente. El valor calculado de la desviación media cuadrática de la raíz (RMSD) del ligando fue de 2,5 Å y la energía de solvatación obtenida, posterior a la formación de la estructura, fue de -28 kcal/mol. Estos valores indican la formación de un complejo estable con alta probabilidad de unión entre el ligando (PEP3) y el receptor (CaMTc).

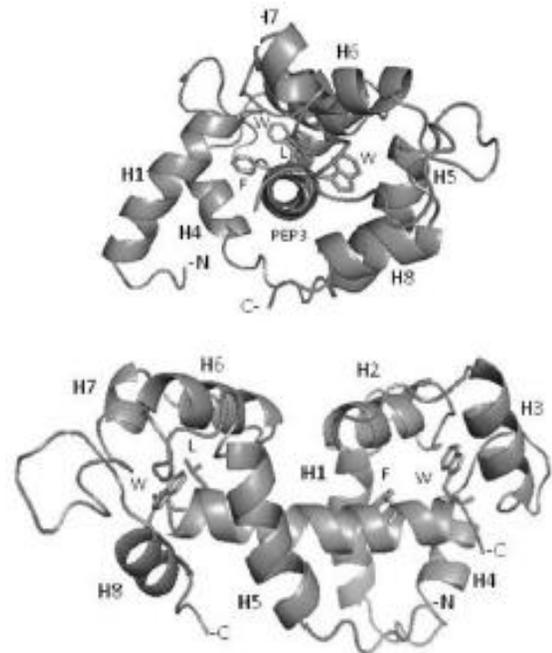


Fig. 2. Análisis *in silico* de la unión de CaMTc al PEP3. Vista frontal (arriba) y lateral (abajo) del acoplamiento molecular CaMTc-PEP3. H1-H8 indican las α -hélices de la CaM y las cadenas laterales de los residuos W_{1039} , L_{1042} , F_{1056} y W_{1060} anclas.

Estos resultados confirman que la secuencia contentiva en el PEP3, S₁₀₃₇RWRRLQAEHVKKPRVVNAFRRAWTD₁₀₆₂, presente en el extremo C-terminal de la enzima, representa el dominio de unión a CaM en la TePMCA. Esta región alberga las anclas hidrofóbicas W₁₀₃₉, L₁₀₄₂, F₁₀₅₆ y W₁₀₆₀ presentando un motivo de unión a CaM del tipo 1-4-18-22.

Referencias

1. Benaim, G., Losada, S., Gadelha, F. y Docampo, R. (1991). A calmodulin-activated (Ca²⁺) Mg²⁺-ATPase is involved in Ca²⁺ transport by plasma membrane vesicles from *Trypanosoma cruzi*. **Biochem. J.**, **280**(3): 715-720.
2. Blaszczyk, M., Kurcinski, M., Kouza, M., Wieteska, L., Debinski, A., Kolinski, A. y Kmiecik, S. (2016). Modeling of protein-peptide interactions using the CABS-dock web server for binding site search and flexible docking. **Methods**, **93**: 72-83.
3. Cariani, L., Thomas, L., Brito, J. y del Castillo, J.R. (2004). Bismuth citrate in the quantification of inorganic phosphate and its utility in the determination of membrane-bound phosphatases. **Anal. Biochem.** **324**(1): 79-83.
4. Clapham, D. (2007). Calcium signaling. **Cell**, **131** (6): 1047-1058.
5. Docampo, R. y Lukes, J. (2012). Trypanosomes and the solution to a 50-year mitochondrial calcium mystery. **Trends Parasitol.**, **28**(1): 31-37.
6. Fiske, C.H. y Subbarow, Y. (1925). The colorimetric determination of phosphorus. **J. Biol. Chem.**, **259**: 15172-15177.
7. Luo, S., Rohloff, P., Cox, J., Uyemura, S.A. y Docampo, R. (2004). *Trypanosoma brucei* plasma membrane-type Ca²⁺-ATPase 1 (TbPMC1) and 2 (TbPMC2) genes encode functional Ca²⁺-ATPases localized to the acidocalcisomes and plasma membrane, and essential for Ca²⁺ homeostasis and growth. **The J. Biol. Chem.**, **279**(14): 14427-14439.
8. Moreno, S.N. y Docampo, R. (2009). The role of acidocalcisomes in parasitic protists. **J. Eukaryot. Microbiol.**, **56**(3): 208-213.
9. Mruk, K., Farley, B.M., Ritacco, A.W. y Kobertz, W.R. (2014). Calmodulation meta-analysis: predicting calmodulin binding via canonical motif clustering. **J. Gen. Physiol.**, **144**(1): 105-114.
10. Pérez-Gordones, M.C., Ramírez-Iglesias, J.R., Cervino, V., Uzcanga, G.L., Benaim, G. y Mendoza, M. (2017). Evidence of the presence of a calmodulin-sensitive plasma membrane Ca²⁺-

ATPase in *Trypanosoma equiperdum*. 2017. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **213**: 1-11.

11. Tidow, H. y Nissen, P. (2013). Structural diversity of calmodulin binding to its target sites, **FEBS J.**, **280**: 5551-5565.
12. Vetter, S. y Leclerc, E. (2003). Novel aspects of calmodulin target recognition and activation. **Eur. J. Biochem.**, **270**: 404-414.

El mecanismo de acción de la miltefosina sobre *Leishmania donovani* implica el deterioro de la función de los acidocalcisomas y la activación del canal de Ca^{2+} de la membrana plasmática dependiente de esfingosina

GUSTAVO BENAİM^{1,2}, ANDREA PINTO MARTINEZ¹, JESSICA RODRIGUEZ¹,
VANESSA HERNANDEZ¹ Y NATHALIA MARTINEZ¹

¹Laboratorio de Biofísica. Centro de Biología Celular. Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. Calle Suapure, Colinas de Bello Monte.

²Laboratorio de Señalización Celular y Bioquímica de Parásitos. Instituto de Estudios Avanzados (IDEA). Caracas – Venezuela. Correo: gbenaim@gmail.com

Leishmania donovani es el causante de la leishmaniasis visceral. La miltefosina es la única droga oral para tratar las infecciones causadas por *L. donovani*. Sin embargo, su mecanismo de acción no se comprende bien. La interrupción de la homeostasis intracelular del Ca^{2+} representa un blanco potencialmente importante para la acción de diferentes fármacos en tripanosomátidos. En esgte sentido hemos descrito un canal de Ca^{2+} en la membrana plasmática en *L. mexicana*, que es similar al canal de Ca^{2+} (VGCC) controlado por voltaje de tipo L presente en humanos. Notablemente, el canal de Ca^{2+} del parásito se activa con la esfingosina, mientras que el VGCC de tipo L no se ve afectado por este esfingolípido. Demostramos que la miltefosina es capaz de activar el canal de Ca^{2+} de la membrana plasmática de *L. donovani*. También mostramos que la miltefosina es capaz de afectar fuertemente a los acidocalcisomas de *L. donovani*, lo que induce la rápida alcalinización de estos orgánulos. Simultáneamente afecta el potencial electroquímico mitocondrial de parásito. En conclusión, demostramos dos nuevos mecanismos de acción de la miltefosina en *L. donovani*, ambos relacionados con la interrupción de la homeostasis del parásito Ca^{2+} .

Introducción

La leishmaniasis es una enfermedad tropical parasitaria desatendida que afecta a millones de personas en todo el mundo. Las estimaciones actuales indican que de 0,2 a 0,4 millones de personas se ven afectadas por la leishmaniasis visceral (LV), que es la forma clínica más grave de la enfermedad, ya que lleva al paciente a la muerte si no se trata. Sus agentes etiológicos son *Leishmania infantum* (en las Américas) y *Leishmania donovani* (Asia, Medio Oriente y África) (14). Los tratamientos clásicos contra la leishmaniasis incluyen antimoniales pentavalentes (Glucantime y Pentostan), que presentan serias desventajas como eficacia limitada, administración parenteral y efectos secundarios marcados. Más recientemente, se ha demostrado que la anfotericina B administrada en el complejo liposomal es muy eficiente (9). Un compuesto similar derivado de la fosfocolina, la miltefosina, ha demostrado una gran eficacia contra *L. donovani* y otros tripanosomátidos como *T. cruzi* y *T. brucei* (7,8).

Además, la miltefosina ha mostrado un efecto sinérgico con varios fármacos, entre otros, con

amiodarona en *L. mexicana* (16). A pesar de sus efectos secundarios como inductor de resistencia y acción teratogénica, es único tratamiento oral para la LV (1,17). Con respecto al mecanismo de acción de la miltefosina, la droga produjo un efecto marcado en la composición de fosfolípidos de tripanosomátidos, afectando la síntesis de fosfatidilcolina al inhibir la fosfatidiletanolamina N-metil-transferasa (18). La miltefosina mostró una reducción de la concentración de fosfatidilcolina en *T. cruzi*. Sorprendentemente, se ha afirmado que la miltefosina inhibe la biosíntesis de fosfatidilcolina en *T. cruzi* con 10 a 20 veces más potencia, en comparación con las células de mamíferos (10), lo que explicaría su alta selectividad como fármaco antiparasitario. El mismo mecanismo se ha descrito también en *L. donovani* (13).

Trabajos previos demuestran que la miltefosina causa una disminución en la tasa de consumo de oxígeno y los niveles de ATP en *L. donovani*, a través de la inhibición del mitocondrial citocromo C oxidasa (11).

Con respecto a la señalización de Ca^{2+} , se sabe que los mecanismos implicados en su regulación en tripanosomátidos constituyen un blanco para agentes quimioterapéuticos como la amiodarona y la

dronedarona en *T. cruzi* y *L. mexicana* (2,3,5,6,15) a través de su acción sobre dos organelos que funcionan como reservorios de Ca^{2+} , la mitocondria y los acidocalcisomas. En *L. mexicana* (4) hemos descrito un homólogo del canal de Ca^{2+} de la membrana plasmática al canal de Ca^{2+} regulado por voltaje tipo L humano (VGCC). Este canal comparte muchas características con su homólogo humano, como antagonismo de los bloqueadores de canales humanos (nifedipina, verapamil). Sin embargo, es estimulado por esfingosina, mientras que el VGCC no (4). En el presente trabajo mostramos nuevos mecanismos de acción de la miltefosina, lo que demuestra que este fármaco puede activar un canal de Ca^{2+} en la membrana plasmática de *L. donovani*. Aunque la miltefosina simuló el efecto de la esfingosina, la activación del canal del parásito con este fármaco no se bloqueó completamente con las dihidropiridinas, como la nifedipina.

*Efecto de la miltefosina sobre la concentración intracelular de Ca^{2+} de los promastigotes de *L. donovani**

Se puede observar (**Fig. 1**) que la adición de miltefosina (4 μM) indujo un gran aumento en el $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Utilizamos esta concentración porque, según una curva de dosis-respuesta, se ha demostrado anteriormente que a 4 μM de miltefosina ejerce su efecto máximo sobre la magnitud del aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en *L. mexicana* (13). La adición de esfingosina (10 μM), que a esta concentración se sabe que activa de manera óptima el canal de la membrana plasmática de Ca^{2+} en *L. mexicana* (4), no mostró ningún efecto adicional.

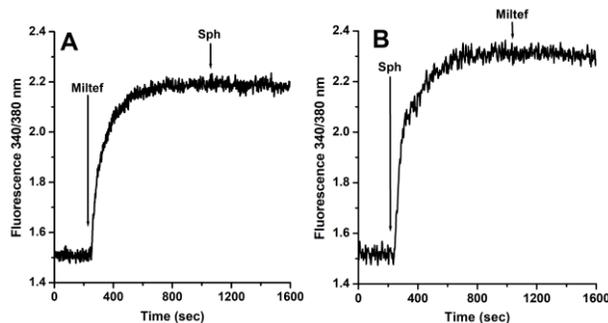


Fig. 1. Efecto de la miltefosina y la esfingosina sobre la concentración intracelular de Ca^{2+} de los promastigotes de *L. donovani*. Los promastigotes se cargaron con Fura 2. (A) Se añadió miltefosina (4 μM) (flecha) en presencia de 2 mM de Ca^{2+} extracelular, seguido de la adición de esfingosina (10 μM). (B) Se añadió esfingosina (10 μM), seguido de miltefosina (4 μM).

Se observó (**Fig. 2A**) que la nifedipina bloquea parcialmente el efecto generado por la miltefosina, mientras que este bloqueador de canal produjo el

bloqueo total de la acción de la esfingosina (**Fig. 2B**), como se reportó en *L. mexicana* (4).

La adición de la digitonina, que rompe la barrera de permeabilidad de la membrana plasmática, indujo un aumento adicional en la señal de Ca^{2+} que alcanzó el nivel máximo de fluorescencia. La adición posterior de EGTA, para quelar todo el Ca^{2+} extracelular, hizo que la señal de fluorescencia alcanzara el nivel más bajo. Estos resultados sugieren que el mecanismo de acción de la miltefosina es similar, pero no idéntico al de la esfingosina. Luego determinamos el efecto de la miltefosina en ausencia de Ca^{2+} extracelular. La **Fig. 2C** muestra que la adición del fármaco, en lugar de inducir un aumento en el $[\text{Ca}^{2+}]_i$, lo redujo, muy por debajo del nivel basal. Esto se debe a la presencia de EGTA, que quela todo el Ca^{2+} extracelular y obliga al Ca^{2+} basal intracelular a dejar el citoplasma hacia el medio exterior.

Se determinó el efecto de la miltefosina después de la adición de nifedipina, y en ausencia de Ca^{2+} extracelular, (**Fig. 3D**). De acuerdo con los resultados obtenidos en las **Figs. 3A** y **3B**, la liberación de Ca^{2+} intracelular obtenida después de la adición de miltefosina en presencia del bloqueador fue menor, en comparación con la droga sola (**Fig. 3C**), indicando un bloqueo parcial del canal y confirmando que nifedipina no bloquea completamente el efecto de activación ejercido por la miltefosina en este canal.

*Efecto de la miltefosina en la mitocondria y los acidocalcisomas de *L. donovani**

Luego, estudiamos el efecto de la miltefosina en un compartimiento muy relevante, también asociado con la regulación intracelular de Ca^{2+} e involucrado en la bioenergética de estos parásitos en *L. donovani*, el acidocalcisoma (4), mediante el uso de naranja de acridina, la cual se acumula en los compartimientos ácidos. La **Fig. 3A** muestra que la adición de miltefosina a los promastigotes cargados con el indicador fluorescente, produjo un gran aumento en la fluorescencia debido a la liberación del fluoróforo, después de su alcalinización por acción del fármaco. La adición ulterior de nigericina, un conocido intercambiador de K^+/H^+ y, por lo tanto, un inductor de la alcalinización de estos organelos produjo un incremento adicional en la fluorescencia. Esto podría significar que la miltefosina no fue capaz de alcalinizar completamente a los acidocalcisomas o implicaría la existencia en el parásito de otros compartimientos ácidos afectados por esta droga. En la **Fig. 3B** realizamos el mismo experimento, pero invertimos el orden de adición de los efectores,

observándose que la nigericina alcaliniza a los acidocalcisomas.

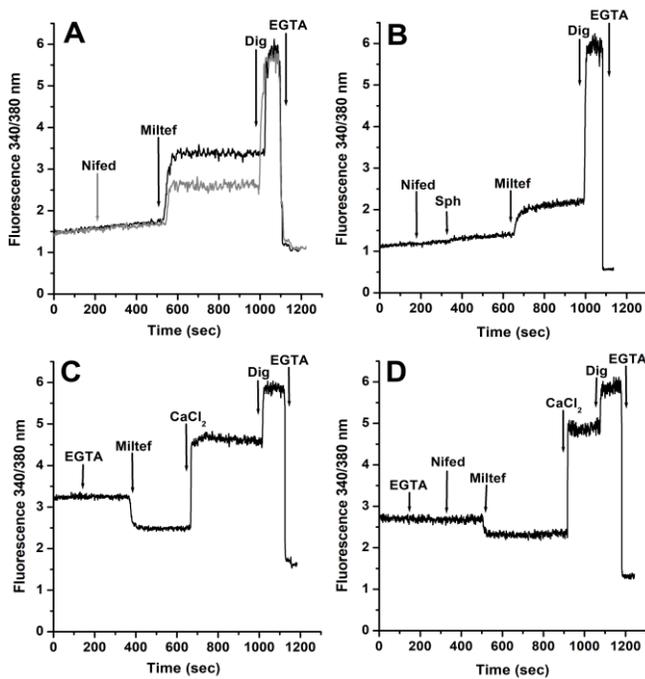


Fig. 2. Efecto de la nifedipina sobre la acción de la miltefosina sobre la concentración intracelular de Ca^{2+} de los promastigotes de *L. donovani*. A) Línea negra: efecto de la miltefosina ($4 \mu\text{M}$) en presencia de CaCl_2 extracelular (2 mM), seguida de digitonina ($40 \mu\text{M}$) y EGTA (flechas), respectivamente. Línea gris: Efecto de nifedipina ($4 \mu\text{M}$), seguida de miltefosina ($4 \mu\text{M}$) en presencia de 2 mM de Ca^{2+} extracelular, seguida de digitonina ($40 \mu\text{M}$) y EGTA. B) Efecto de la nifedipina seguida de esfingosina, miltefosina, digitonina y EGTA (flechas). C) Efecto de la miltefosina en ausencia de Ca^{2+} extracelular. Se añadió EGTA para quelar cualquier Ca^{2+} (flecha) extracelular contaminante, seguido de miltefosina ($4 \mu\text{M}$), CaCl_2 (2 mM), digitonina y EGTA, respectivamente. D) Efecto de la miltefosina después de la adición de nifedipina en ausencia de Ca^{2+} extracelular.

Con respecto a la presencia de un homólogo activado por esfingosina del VGCC humano de tipo L en *L. donovani*, hemos demostrado que éste existe tanto en *L. mexicana* (4) como en *L. donovani* (12). La secuencia completa del gen para el canal de *L. mexicana* es 94% similar a la secuencia de *L. donovani* (4,12). Esta alta homología explica las similitudes obtenidas con respecto a la apertura del canal por la esfingosina, así como la activación de Bay K 8644 y el antagonismo de la nifedipina.

Con respecto a la presencia de un homólogo del VGCC humano tipo L en *L. donovani*, hemos demostrado que éste existe tanto en *L. mexicana* (4) como en *L. donovani* (12). La secuencia completa del

gen para el canal de *L. mexicana* es 94% similar a la secuencia de *L. donovani* (4,12). Esta alta homología explica la similitud obtenidas durante este trabajo con respecto a la apertura del canal por la esfingosina, así como la activación de Bay K 8644 y el antagonismo de la nifedipina.

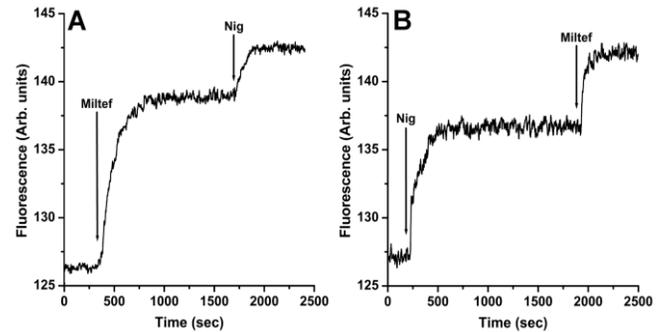


Fig. 3. Efecto de la miltefosina en acidocalcisomas en promastigotes de *L. donovani*. Los parásitos se cargaron con naranja de acridina (2 mM). La longitud de onda de excitación fue de 488 nm y la emisión fue de 530 nm . A) Se agregó miltefosina ($4 \mu\text{M}$) (flecha) directamente a la cubeta con promastigotes cargados con naranja de acridina, seguido de la adición de nigericina ($2 \mu\text{M}$). B) Se añadió nigericina (flecha) seguido de miltefosina en ausencia de Ca^{2+} extracelular.

En conclusión, los resultados demuestran un doble efecto de la miltefosina sobre *L. donovani*: la apertura del canal de Ca^{2+} de la membrana plasmática y un efecto directo sobre los acidocalcisomas, que en combinación producirían una gran acumulación de Ca^{2+} intracelular, conllevando a la muerte de parásito.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por los proyectos CDCH-UCV PG-03-8728-2013/2 y FONACIT 2011000884 y 2018000010 a G.B.

Referencias

1. Agrawal, V.K. y Singh, Z. (2006). Miltefosine: First oral drug for treatment of visceral leishmaniasis. *Med. J. Armed Forces India*, **62**: 66-67.
2. Benaim, G., Casanova, P., Hernández-Rodríguez, V., Mujica-González, S., Parra-Giménez, N., Plaza-Rojas, L., Concepción J.L., Liu, Y.-L., Oldfield, E., Paniz-Mondolfi, A. y Suárez, A.I. (2014). dronedarone, an amiodarone analog with improved anti-*Leishmania mexicana* efficacy. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **58**: 2295-2303.
3. Benaim, G. y García, C.R.S. (2011). Targeting calcium homeostasis as the therapy of Chagas'

- disease and leishmaniasis - a review. **Trop. Biomed.**, **28**: 471-481.
4. Benaim, G., García-Marchán, Y., Reyes, C., Uzcanga, G. y Figarella, K. (2013). Identification of a sphingosine-sensitive Ca²⁺ channel in the plasma membrane of *Leishmania mexicana*. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, **430**: 1091–1096.
 5. Benaim, G., Hernández-Rodríguez, V., Mujica-González, S., Plaza-Rojas, L., Silva, M.L., Parra-Giménez, N., García-Marchán, Y., Paniz-Mondolfi, A. y Uzcanga, G. (2012). *In vitro* anti-*Trypanosoma cruzi* activity of dronedarone, a novel amiodarone derivative with an improved safety profile. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **56**: 3720-3725.
 6. Benaim, G., Sanders, J.M., García-Marchán, Y., Colina, C., Lira, R., Caldera, A.R., Payares, G., Sanoja, C., Burgos, J.M., León-Rossell, A., Concepción, J.L., Schijman, A.G., Levin, M., Oldfield, E. y Urbina, J.A. (2006). Amiodarone has intrinsic anti-activity and acts synergistically with posaconazole. **J. Med. Chem.**, **49**: 892-899.
 7. Croft, S.L., Neal, R.A., Pendergast, W. y Chan J.H. (1987). The activity of alkyl phosphorylcholines and related derivatives against *Leishmania donovani*. **Biochem. Pharmacol.**, **36**: 2633-2636.
 8. Croft, S.L., Snowdon, D. y Yardley, V. (1996). The activities of four anticancer alkyllysophospholipids against *Leishmania donovani*, *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei*. **J. Antimicrob. Chemother.**, **38**: 1041-1047.
 9. Freitas-Junior, L.H., Chatelain, E., Kim, H.A. y Siqueira-Neto, J.L. (2012). Visceral leishmaniasis treatment: What do we have, what do we need and how to deliver it? **Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.**, **2**: 11–19.
 10. Lira, R., Contreras, L.M., Rita, R.M.S. y Urbina, J.A. (2001). Mechanism of action of anti-proliferative lysophospholipid analogues against the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*: potentiation of *in vitro* activity by the sterol biosynthesis inhibitor ketoconazole. **J. Antimicrob. Chemother.**, **47**: 537-546.
 11. Luque-Ortega, J.R. y Rivas, L. (2007). Miltefosine (hexadecylphosphocholine) inhibits cytochrome c oxidase in *Leishmania donovani* promastigotes. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **51**: 1327-1332.
 12. Pinto-Martínez, A., Rodríguez-Durán, J., Serrano-Martin, X., Hernández-Rodríguez, V. y Benaim, G. (2018). Mechanism of action of miltefosine on *Leishmania donovani* involves the impairment of acidocalcisome function and the activation of the sphingosine-dependent plasma membrane Ca²⁺ Channel. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **62**: 1-10.
 13. Rakotomanga, M., Blanc, S., Gaudin, K., Chaminade, P. y Loiseau, P.M. (2007). Miltefosine affects lipid metabolism in *Leishmania donovani* promastigotes. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **51**: 1425–1430.
 14. Ready, P.D. (2014). Epidemiology of visceral leishmaniasis. **Clin. Epidemiol.**, **6**: 147-154.
 15. Serrano-Martín, X., García-Marchán, Y., Fernández, A., Rodríguez, N., Rojas, H., Visbal, G. y Benaim, G. (2009a). Amiodarone destabilizes intracellular Ca²⁺ homeostasis and biosynthesis of sterols in *Leishmania mexicana*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **53**: 1403-1410.
 16. Serrano-Martín, X., Payares, G., De Lucca, M., Martínez, J.C., Mendoza-León, A. y Benaim G. (2009b). Amiodarone and miltefosine act synergistically against *Leishmania mexicana* and can induce parasitological cure in a murine model of cutaneous leishmaniasis. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **53**: 5108-5113.
 17. Sundar, S., Gupta, L.B., Makharia, M.K., Singh, M.K., Voss, A., Rosenkaimer, F., Engel, J. y Murray, H.W. (1999). Oral treatment of visceral leishmaniasis with miltefosine. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, **93**: 589–597.
 18. Urbina, J.A. (2006). Mechanisms of action of lysophospholipid analogues against trypanosomatid parasites. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **100**(Suppl. 1): S9-S16.

Efecto de un derivado del benzofurano basado en la estructura de la amiodarona sobre *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania donovani*

NATHALIA MARTÍNEZ^{1,2}, ANDREA PINTO², JESSICA RODRÍGUEZ² Y GUSTAVO BENAİM^{1,2}

¹Laboratorio de Biofísica. Centro de Biología Celular. Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. Calle Suapure, Colinas de Bello Monte.

²Laboratorio de Señalización Celular y Bioquímica de Parásitos. Instituto de Estudios Avanzados (IDEA). Carretera Nacional de Hoyo de la Puerta, Valle de Sartenejas. Caracas – Venezuela.

Correo: gbenaim@gmail.com

Los parásitos *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania* sp. causantes del mal de Chagas y la leishmaniasis, respectivamente, actualmente representan un problema de salud pública a nivel mundial. Las drogas actualmente disponibles para estas enfermedades, presentan muchos efectos secundarios y en el caso del mal de chagas son inefectivas en la fase crónica. Hemos demostrado que la amiodarona, un anti-aritmico de uso frecuente, posee una alta efectividad sobre *T. cruzi* y sobre *L. mexicana*, especialmente si se combina con la miltefosina, droga de uso actual contra la leishmaniasis. El mecanismo de acción es a través de la desestabilización de la homeóstasis intracelular del Ca^{2+} . En los tripanosomatidios, dos organelos contribuyen con la regulación del Ca^{2+} intracelular: un único y gran mitocondrion y los acidocalcisomas. Recientemente, se sintetizó un benzofurano (AMIODER) basado en la estructura de esta droga. Hemos demostrado que el AMIODER presenta capacidad parasiticida, tanto sobre *T. cruzi* como *L. donovani*, siendo el mecanismo de acción de esta droga para ambos parásitos la alteración de la homeostasis intracelular de Ca^{2+} producto de su liberación desde la mitocondria y los acidocalcisomas. Además, se determinó que el efecto del AMIODER es diez veces mayor sobre *L. donovani* que sobre *T. cruzi* en amastigotes.

Introducción

Los parásitos *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania* sp. generan el mal de Chagas y la leishmaniasis, respectivamente, las cuales actualmente representan un grave problema de salud pública a nivel mundial (12) y afectan principalmente a las poblaciones más pobres del mundo. La leishmaniasis es transmitida al ser humano por la picadura de insectos dípteros del género *Phlebotomus* sp. o *Lutzomyia* sp. (4), mientras que *T. cruzi* es transmitida por insectos hematófagos infectados, conocidos como “Chipos”. En ambos casos, pero con menos frecuencia, son transmitidas de manera congénita y parenteral (transfusión de sangre, jeringas compartidas y accidentes de laboratorio (10).

Leishmania sp. posee características morfológicas y moleculares diferentes, según sea el hospedador, la forma de promastigote móvil, el cual posee un flagelo libre que se sitúa por delante del kinetoplasto (estructura constituida de ADN y presente en la mitocondria del parásito) y su forma amastigote de localización intracelular (1), mientras que *T. cruzi* posee 3 estadios durante su ciclo de vida que difieren desde el punto de vista morfológico, metabólico y molecular. Los epimastigotes y amastigotes intracelulares son las formas proliferativas mientras que los tripomastigotes no

son proliferativos. Cabe destacar que el estadio amastigote es la forma clínicamente relevante de ambos parásitos, debido a que es el causante directo de todos los síntomas de estas enfermedades, por lo que cualquier quimioterapia alternativa contra la leishmaniasis o tripanosomiasis se basa en la eliminación de este estadio del parásito (4). La amplia variedad de *Leishmania* spp. responsable de la leishmaniasis, combinada con la respuesta inmunitaria del hospedador, resulta en un amplio espectro de manifestaciones clínicas (15): leishmaniasis cutánea (localizada o difusa), leishmaniasis mucocutánea y leishmaniasis visceral, siendo esta última la que causa mayor mortalidad en humanos y sus agentes etiológicos principales son *Leishmania donovani* en el viejo mundo y *Leishmania infantum* en el nuevo mundo.

El Ca^{2+} ha sido ampliamente reconocido como un mensajero esencial en todos los eucariotas, desde protozoarios hasta mamíferos (4). Estos últimos son capaces de mantener una concentración citosólica de Ca^{2+} libre muy reducida (alrededor de 100 nM) en presencia de una concentración extracelular de Ca^{2+} mucho mayor (1-2 mM). Este hecho implica la presencia de diferentes mecanismos de transporte que permitan mantener dicho gradiente de concentración, algunos de ellos localizados en

organelos intracelulares y otros en la membrana plasmática (2). En los tripanosomatidios tres organelos contribuyen con la regulación del Ca^{2+} intracelular: un gran mitocondrion, capaz de acumular grandes cantidades de Ca^{2+} , siendo la fuerza que dirige la acumulación de este catión el gradiente electroquímico de H^+ a través de la membrana mitocondrial interna (3), el retículo endoplasmático y los acidocalcisomas (8), asociados a la bioenergética del parásito, ya que constituye un depósito de polifosfatos y pirofosfatos. Estos últimos son una fuente alternativa de energía al ATP en estos parásitos. En los acidocalcisomas se acumulan grandes cantidades de Ca^{2+} (4). La alteración de la homeostasis del Ca^{2+} en cualquier célula, tiene efectos letales que conducen a la muerte celular mediante apoptosis o necrosis (16), por lo que dicha alteración de la homeostasis del Ca^{2+} intracelular en estos parásitos podría ser una estrategia prometedora como blanco de nuevas drogas (4). Una de las estrategias de investigación para el desarrollo de drogas involucra la síntesis de compuestos *de novo*, con base en las estructuras químicas de diversos agentes que han mostrado especificidad contra blancos en microorganismos de interés clínico.

En 2009 reportamos que la amiodarona, un antiarrítmico ampliamente utilizado para el tratamiento de pacientes con mal de Chagas que presentan cardiomiopatía chagásica, tiene efecto tripanocida a través de la alteración de la homeostasis del Ca^{2+} intracelular en promastigotes y amastigotes intracelulares de *L. mexicana*, como consecuencia de la liberación de este catión de la mitocondria y de los acidocalcisomas (14). Además, la amiodarona demostró un efecto sinérgico con miltefosina sobre *L. mexicana* (13). Sin embargo, la presencia de un 2,5-diiodofenil en su estructura, la cual ha estado asociada con efectos secundarios no deseados relacionados a una toxicidad tiroidea, hace que su uso prolongado como antiarrítmico se convierta en una dificultad terapéutica. Por este motivo, se sintetizó la dronedarona, un derivado de la amiodarona, en la cual se reemplaza la estructura 2,5-diiodofenil con un grupo fenil sustituto y se incorpora un grupo metil sulfonil, lo cual permitió la reducción de la alta hidrofobicidad de la droga parental. La dronedarona también afecta la viabilidad de promastigotes y amastigotes intracelulares de *L. mexicana*, al afectar la homeostasis del Ca^{2+} intracelular del parásito como consecuencia de la liberación de este ion de organelos intracelulares, tales como la mitocondria y los acidocalcisomas (5).

Hejchman y col. (10), basados en la estructura de la amiodarona, sintetizaron 12 compuestos derivados de los ácidos 2- y 3-benzofurancarboxílicos, de los que el derivado 4 (Metil-7-acetil-5-bromo-6-hidroxi-3-bromo-metil-2-benzofurancarboxilato), denominado por nuestro laboratorio como AMIODER (11), inhibió completamente el crecimiento de *Cryptococcus neoformans* a una concentración de 20 μM .

Recientemente, reportamos que el AMIODER tiene actividad *in vitro* contra *T. cruzi*, siendo parte de su mecanismo de acción el colapso del potencial electroquímico mitocondrial y la alcalinización de los acidocalcisomas de epimastigotes de *T. cruzi* (11). Por esta razón, nos planteamos también estudiar el efecto del AMIODER sobre *L. donovani*. Los resultados obtenidos muestran que el AMIODER tiene un efecto dosis-dependiente sobre la proliferación de promastigotes de *L. donovani* (Fig. 1), con un IC_{50} de 3,62 μM (calculado luego de 72 h del tratamiento de los parásitos), siendo este valor significativamente menor que el obtenido para *T. cruzi*, de 10 μM (11). Adicionalmente, se observó un efecto inhibitorio en amastigotes, obteniendo un IC_{50} de 0,14 μM (Fig. 2A), aproximadamente diez veces menor que el reportado para amastigotes de *T. cruzi* (Fig. 2B) (11), sin afectar a las células huésped (macrófagos) hasta una concentración de 14 μM , confiriéndole un índice de selectividad (IS) de 4 (resultados no mostrados).

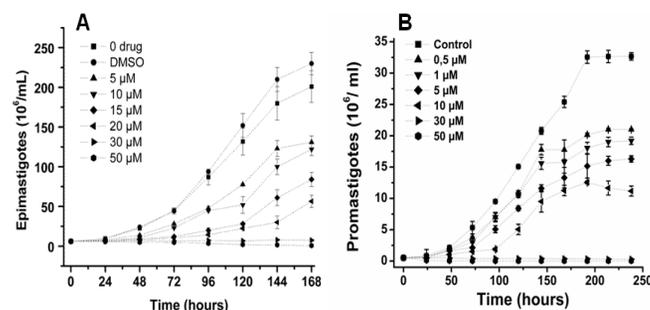


Fig. 1. Efecto del AMIODER sobre la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi* (A) y promastigotes de *L. donovani* (B).

Con el objeto de determinar el posible mecanismo de acción del AMIODER en estos tripanosomatidios, evaluamos el efecto de esta droga sobre la homeostasis del Ca^{2+} intracelular. La relación 340/380 nm del indicador fluorescente Fura-2 es directamente proporcional a la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (9). Obtuvimos que el AMIODER (10 μM) induce un incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular de los parásitos, tanto en presencia (Fig. 3A) como en ausencia de Ca^{2+} extracelular (Fig. 3B).

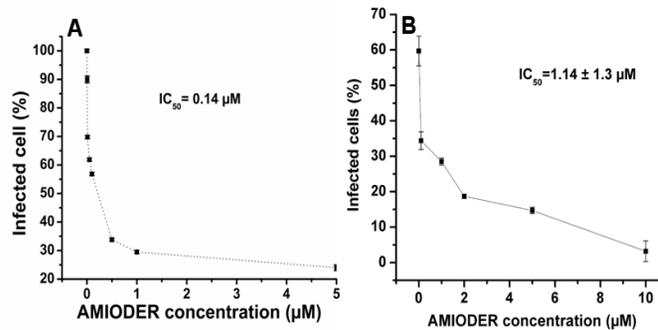


Fig. 2. Efecto del AMIODER sobre amastigotes intracelulares de *L. donovani* y *T. cruzi*.

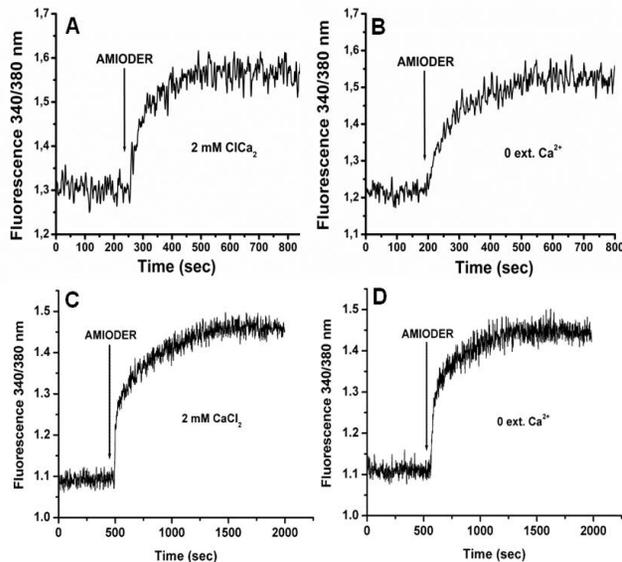


Fig. 3. Efecto del AMIODER sobre la homeostasis del Ca^{2+} intracelular de promastigotes de *L. donovani* y epimastigotes de *T. cruzi* tanto en presencia (A y C, respectivamente) como en ausencia de Ca^{2+} extracelular (8 mM EGTA). Se representa la relación de fluorescencia 340/380 nm (unidades arbitrarias) en función del tiempo en segundos.

Un resultado similar fue obtenido para epimastigotes de *T. cruzi* (11). Aún más, la pendiente del incremento en ambos casos es la misma. Esto indica que este incremento es debido a la liberación de este catión de compartimientos intracelulares.

Debido a que la mitocondria y los acidocalcisomas son algunos de los organelos involucrados en la regulación del Ca^{2+} en tripanosomatidos, evaluamos el efecto del AMIODER sobre el potencial electroquímico mitocondrial y los acidocalcisomas de promastigotes de *L. donovani*. En la **Fig. 4A** se observa que el AMIODER (10 μM) colapsa el potencial electroquímico mitocondrial de estos parásitos al igual que lo hace en *T. cruzi* (**Fig. 4C**) sin observarse un efecto posterior del protonóforo FCCP a 2 μM (**Figs. 4B y 4D**).

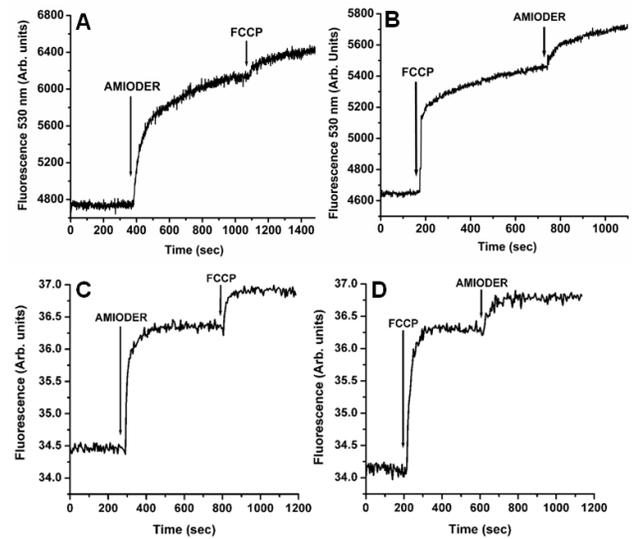


Fig. 4. Efecto del AMIODER sobre el potencial electroquímico mitocondrial en *L. donovani* (A y B) y *T. cruzi* (C y D). Se representa la fluorescencia (unidades arbitrarias) en función del tiempo en segundos.

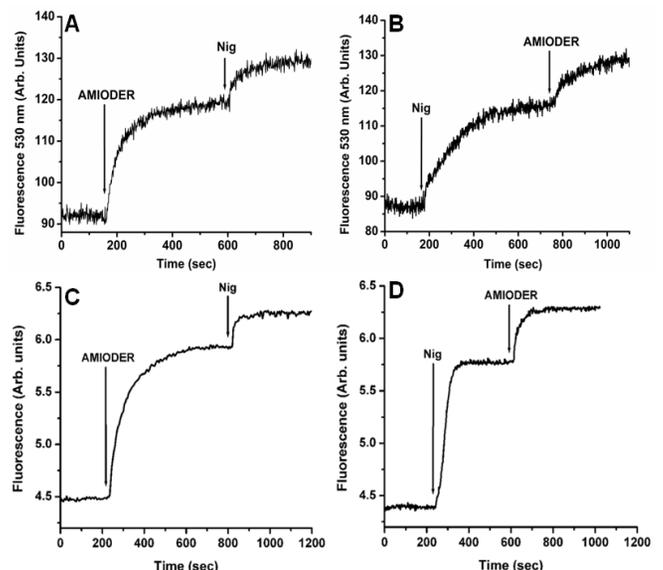


Fig. 5. Efecto sobre los acidocalcisomas de promastigotes de *L. donovani* y epimastigotes de *T. cruzi*. Se representa la fluorescencia (unidades arbitrarias) en función del tiempo en segundos.

Por otro lado, el AMIODER (10 μM) alcaliniza parcialmente los acidocalcisomas de promastigotes de *L. donovani* y los epimastigotes de *T. cruzi* (**Figs. 5A y 5C**), pues se observa un efecto ulterior de la nigericina, un intercambiador K^+/H^+ que alcaliniza completamente los acidocalcisomas de estos organismos. Este efecto sugiere la existencia de otros compartimientos ácidos sobre los cuales el compuesto podría estar actuando (6). Estos resultados pueden deberse a que la naranja de acridina se acumula en los organelos ácidos, y aunque los acidocalcisomas son los organelos ácidos predominantes en tripanosomatidos,

existen otros compartimientos como fagolisosomas y/o vacuolas acídicas, que podrían estar acumulándose en pequeñas cantidades del fluoróforo y provocando su liberación tras la adición de la droga (7).

Todos estos resultados indican que parte del incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular es con alta probabilidad debido a la liberación de este catión de la mitocondria y los acidocalcisomas de estos parásitos.

Todo lo anterior apoya la idea de profundizar estos estudios en busca de derivados del benzofurano basados en la estructura de la amiodarona, orientados hacia la búsqueda de una posible terapia contra la leishmaniasis y tripanosomiasis.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por los proyectos CDCH-UCV C-03-8728-2013/2 y FONACIT Proyecto 2011000884 y Proyecto 2018000010 a G.B.

Referencias

1. **Becerril, M.** (2011). **Parasitología médica.** McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A., Tercera Edición, Distrito Federal, México.
2. **Benaim, G., Cervino, V., Hermoso, T., Felibert, P. y Laurentin, A.** (1993). Intracellular calcium homeostasis in *Leishmania mexicana*. Identification and characterization of a plasma membrane calmodulin-dependent Ca^{2+} -ATPase. **Biol. Res., 26:** 141-150.
3. **Benaim, G. y Cervino, V.** (2000). Intracellular Calcium Homeostasis and Signaling in Trypanosomatids. **Elect. J. Pathol. Histol., 6:** 1-11.
4. **Benaim, G. y García, C.** (2011). Targeting calcium homeostasis as the therapy of Chagas disease and leishmaniasis - a review. **Trop. Biomed., 28:** 471-481.
5. **Benaim, G., Casanova, P., Hernández-Rodríguez, V., Mujica-González, S., Parra-Giménez, N., Plaza-Rojas, L., Concepción, J., Liu, Y.-L., Oldfield, E., Paniz-Mondolfi, A. y Suárez, A.I.** (2014). Dronadarone, an amiodarone analog with improved anti-*Leishmania mexicana* efficacy. **Antimicrob. Agents. Chemother., 58:** 2295-2303.
6. **Benaim, G., Sanders, J.M., García-Marchán, Y., Colina, C., Lira, R., Caldera, A.R., Payares, G., Sanoja, C., Burgos, J.M., Leon-Rossell, A., Concepción, J.L., Schijman, A.G., Levin, M., Oldfield, E. y Urbina, J.A.** (2006). Amiodarone has intrinsic anti-*Trypanosoma cruzi* activity and acts synergistically with posaconazol. **J. Med. Chem., 49:** 892-899.
7. **De Gouveia, Y.M., Hernández-Rodríguez, V., Rodríguez-Durán, J., Suárez, A.I. y Benaim, G.** (2018). Efecto de un metilendioxi-flavonoide aislado de *Iresine diffusa* sobre la viabilidad celular de *Leishmania mexicana* y la homeostasis intracelular del Ca^{2+} . **Investigación Clínica, 58:** 334-351.
8. **Grynkiewicz, G., Poenie, M. y Tsien, R.** (1985). A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. **J. Biol. Chem., 260:** 3440-3450.
9. **Herwaldt, B.** (1999). Leishmaniasis. **Lancet, 354:** 1191-1199.
10. **Hejchman, E., Ostrowska, K., Maciejewska, D., Kossakowski, J. y Courchense, J.E.** (2012). Synthesis and antifungal activity of derivatives of 2- and 3-benzofurancarboxylic acids. **J. Pharmacol. Exp. Theor., 343:** 380-388.
11. **Pinto-Martínez, A., Hernández-Rodríguez, V., Rodríguez-Durán, J. y Benaim, G.** (2018). Anti-*Trypanosoma cruzi* action of a new benzofuran derivative based on amiodarone structure. **Exp. Parasitol., 189:** 8-15.
12. **Reithinger, R., Brooker, S. y Kolaczinski, J.H.** (2007). Visceral leishmaniasis in eastern Africa-current status. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 101:** 1169-1170.
13. **Serrano-Martín, X., García-Marchán, Y., Fernandez, A., Rodríguez, N., Rojas, H., Visbal, G. y Benaim, G.** (2009a). Amiodarone destabilizes intracellular Ca^{2+} homeostasis and biosynthesis of sterols in *Leishmania mexicana*. **Antimicrob. Agents. Chemother., 53:** 1403-1410.
14. **Serrano, X., Payares, G., De Lucca, M., Martínez, J., Mendoza, A. y Benaim, G.** (2009b). Amiodarone and miltefosine act synergistically against *Leishmania mexicana* and can induce parasitological cure in a murine model of cutaneous leishmaniasis. **Antimicrob. Agents Chemother., 53:** 5108-5113.
15. **Silva-Jardim, I., Thiemann, O. y Anibal, F.** (2014). Leishmaniasis and Chagas disease chemotherapy: A critical review. **J. Braz. Chem. Soc., 25:** 1810-1823.
16. **Zhivotovsky, B. y Orrenius, S.** (2011). Calcium and cell death mechanisms: A perspective from the cell death community. **Cell Calcium, 50:** 211-221.

Autofagia: mecanismo de sobrevivencia y/o muerte celular

FRANCEHULI DAGGER BOYER

Laboratorio de Biología Celular de Parásitos. Centro de Biología Celular
Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela
Calle Suapure, Colinas de Bello Monte. Caracas - Venezuela. Correo: chichadagger@gmail.com

La autofagia es un proceso omnipresente en todos los eucariotas, donde se ha descubierto una maquinaria genética adaptada para diferentes linajes celulares. Han sido descritos varios tipos de autofagia, involucrados en numerosos procesos fisiológicos donde funciona como un mecanismo protector; sin embargo, se ha descrito también que puede actuar en determinadas circunstancias como un mecanismo de muerte celular. En el proceso de diferenciación *in vitro* de *Leishmania mexicana* de la forma promastigote a la forma amastigote, hemos reportado un nuevo proceso selectivo parecido a autofagia dirigido a degradar complejos de membrana-microtúbulos redundantes, en respuesta a la elevación de la temperatura y acidificación del medio, imitando así los cambios que sufre el parásito durante la invasión del macrófago. Este proceso de diferenciación es importante para la sobrevivencia del parásito dentro del macrófago y la virulencia. Puede ser un modelo útil para estudiar el efecto de drogas dirigidas a bloquear la diferenciación y sobrevivencia del parásito, como nueva estrategia para combatir la enfermedad.

Introducción

Autofagia es un proceso autodegradativo, esencial para la sobrevivencia, desarrollo, diferenciación y homeostasis. Se estableció para distinguir la degradación lisosomal o de digestión de parte de la propia célula (autofagia), de la degradación de material extracelular vía endosomal (heterofagia) y ha sido definido como el proceso mediante el cual las células disponen de organelos dañados o redundantes o de complejos macromoleculares, degradándolos como respuesta a una condición de “stress” (15). La destrucción de un organelo puede ser parte de un proceso normal de diferenciación o disparado por condiciones de “stress”, lo que permite a la célula adaptarse a cambios ambientales o de desarrollo. Es un proceso omnipresente en eucariotas, ya que hay una maquinaria autofágica en todos los mayores linajes eucariotas. Debe haber estado presente en el ancestro común.

Autofagia

La autofagia fue considerada inicialmente un simple proceso degradativo, pero es más adecuado describirla como una vía de reciclaje para destacar su importante contribución a la Fisiología Celular, ya que los metabolitos generados en los lisosomas o en vacuolas son reusados como fuentes de energía o bloques constructores para la síntesis de nuevas macromoléculas (14). Ha sido también considerada como un mecanismo protector el cual se dispara ante situaciones de “stress” celular, como la presencia de productos tóxicos, invasiones bacteriales y virales y en tripanosomatideos, ante la presencia de drogas y durante el proceso de diferenciación a través de su ciclo de vida (2,17).

Ha habido controversias acerca si la autofagia forma parte de una muerte celular programada tipo II (10). Se ha planteado que puede haber una coordinación entre apoptosis (muerte programada tipo I) y autofagia. En la mayoría de las situaciones, la autofagia funciona como un mecanismo protector, pero si el daño celular es muy extenso o si está comprometida la apoptosis, la autofagia puede ser usada para matar la célula (6). Está involucrada en muchos procesos fisiológicos: adaptación a la escasez de nutrientes, diferenciación celular y desarrollo, degradación de estructuras aberrantes, recambio de organelos, supresión tumoral, inmunidad innata y adaptativa, regulación del metabolismo, transporte de membranas, regulación metabólica de lípidos, entre muchos otros.

El grupo de Yoshinori Oshimi, Premio Nobel de Medicina 2016 por el descubrimiento de los mecanismos subyacentes de la autofagia, llevó a cabo el primer “screening” genético en levaduras. Un aspecto intrigante de la maquinaria autofágica es la presencia de dos sistemas nuevos de conjugación que involucran a proteínas parecidas a ubiquitinas, ATG8 y ATG12 (20). Se han identificado muchos genes que codifican proteínas involucradas en la autofagia (proteínas ATG) (13). Luego explotó el análisis molecular de la autofagia en mamíferos y tripanosomatideos (5,18).

Se han evidenciado al menos tres tipos de autofagia que difieren respecto al mecanismo, función fisiológica y especificidad del contenido endosomal: 1) Macroautofagia (no selectiva), caracterizada por

el secuestro de estructuras citoplasmáticas en unas vesículas denominadas autofagosomas, con doble membrana. Los metabolitos que se generan son transportados al citoplasma, para su reuso; 2) autofagia mediada por chaperonas; y 3) Microautofagia, en la cual la membrana lisosomal, se invagina e incorpora material para su digestión (9). Hay otros procesos denominados selectivos, parecidos a autofagia como la pexofagia (degradación de peroxisomas), mitofagia (mitocondrias), PMN (porciones de la membrana nuclear), entre otros (21). Recientemente, hemos reportado un nuevo mecanismo selectivo, parecido a autofagia, durante el proceso de diferenciación *in vitro* de *Leishmania mexicana* de la forma promastigote a la forma amastigote (22). Este proceso es el responsable de la reducción de tamaño y el cambio de forma del promastigote con flagelo libre (15 a 20 μm de largo) presente en el intestino del vector, a la forma amastigote redondeada, sin flagelo libre (4 a 5 μm) idéntica a la forma que reside en el macrófago del huésped vertebrado. Este proceso es caracterizado por una extensiva autofagocitosis del complejo membrana plasmática-citoesqueleto, formándose bolsillos profundos de diferentes tamaños y amplitud que se cierran y fusionan en el interior del citoplasma del parásito, formando vesículas rodeadas de microtúbulos, los cuales se depolimerizan en corto tiempo. Después de 24 horas, 70% de la población celular presenta una reducción de tres veces el perímetro de la forma promastigote de 70-120 μm a 40-45 μm de la forma ovalada parecida a amastigote. El proceso de autofagocitosis del complejo membrana-microtúbulos es completado a las 72 horas en medio LIT y antes de las 24 horas en medio RPMI. Este proceso de autofagia se genera a pH 7,0 y a pH 5,5 elevando la temperatura a 35°C (8). Hay presencia de abundantes gotas lipídicas en el citoplasma, lo que puede ser el producto de cambios en el metabolismo lipídico durante el proceso (**Fig. 1**) (11,19).

El factor clave en el proceso de diferenciación es el cambio de temperatura de 25 a 35°C (23). Otros eventos importantes ocurren, como el acortamiento del flagelo debido a un continuo proceso de depolimerización del ensamblaje microtubular y cambios en la localización y fragmentación del mitocondrion. La transformación a la forma amastigote dentro de los macrófagos es importante para la sobrevivencia de los parásitos dentro de los macrófagos y para la virulencia (1,3). En contraste, promastigotes de *Leishmania* no patogénicas son

lisados dentro de la vacuola parasitófora, luego de ser fagocitados.

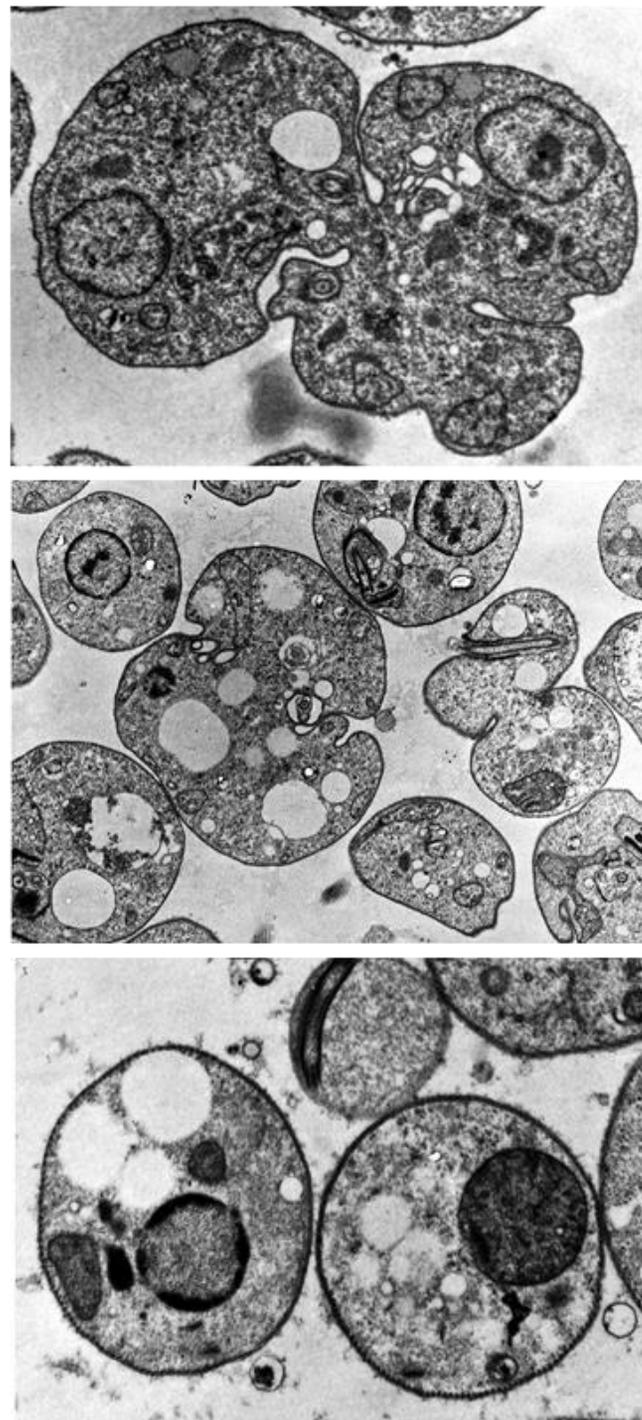


Fig. 1. Promastigotes incubados en medio LIT a 35°C, pH 7,0 durante 24 horas, con invaginaciones profundas de la membrana. A las 48 horas están presentes en menor extensión y a las 96 horas, la forma amastigote redondeada con grandes gotas de lípidos.

Un proceso parecido a autofagia ha sido descrito en parásitos tripanosomatídeos (16), que parece importante en el remodelaje celular durante la

diferenciación del parásito a través de los estadios de su ciclo de vida (12). Ha sido demostrada la presencia de glycosomas, retículo endoplasmático y fragmentos de mitocondria dentro de autofagosomas (4). El complejo proceso de invaginación autofágica del complejo membrana plasmática–microtúbulos, es la primera vez que ha sido reportado y aunque ha sido demostrado en un modelo simplificado *in vitro*, puede ser utilizado para el estudio del efecto de drogas dirigidas a bloquear la diferenciación del parásito y la sobrevivencia del amastigote en la célula huésped (7).

Referencias

1. Alcolea, P.J., Alonso, A., Gómez, M.J. y col. (2010). Temperature increase prevails over acidification in gene expression modulation of amastigote differentiation in *Leishmania infantum*. *BMC Genomics*, **11**: 31.
2. Bera, A., Singh, S., Nagaray, L. y Vaydia, T. (2003). Induction of autophagic cell death in *Leishmania donovani* by antimicrobial peptides. *Mol. Biochem. Parasitol*, **127**: 232-225.
3. Besteiro, S., Williams, R.A.M, Morrison, L.S., Coombs, G.H. y Mottram, J.C. (2006). Endosome sorting and autophagy are essential for differentiation and virulence of *Leishmania major*. *J. Biol. Chem.*, **281**: 11384-11396.
4. Brennand, A. (2011). Autophagy in parasitic protists: Unique features and drug targets. *Molecular Biochem. Parasitol.*, **177**: 83-99.
5. Brennand, A., Rico, E. y Michels, P.A.M. (2012). Autophagy in trypanosomatids. *Cells*, **1**: 346-371.
6. Campos Salinas, J. y Gonzalez-Rey, E. (2009). Autophagy and neuropeptides at the crossroad for parasite to survive or to die? *Autophagy*, **5**: 551-554.
7. Cull, B., Lima Prado, J., Fernandez, J. y cols. (2014). Glycosome turnover in *Leishmania major* is mediated by autophagy. *Autophagy*, **10**: 2143-2157.
8. Dagger, F., Bengio, C., Martínez, A. y Ayesta C. (2018). *Leishmania mexicana* differentiation involves a selective plasma membrane autophagic-like process. *Cell Stress and Chaperones*, **23**: 783-789.
9. Debrabant, A., Joshi, M.B., Pimenta, F. y Dwyer, D. (1991). *Leishmania donovani* long term culture of axenic amastigotes at 37°C. *Exp. Parasitol.*, **73**: 326-334.
10. Edinger, A.L. y Thompson, C.B. (2004). Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **16**: 663-669.
11. Greenblatt, Ch. y Wetzel, B.K. (1966). Alterations in fatty acid metabolism and morphology of *Leishmania enrietti* exposed to elevated temperature. *J. Protozoology*, **13**: 521-531.
12. Herman, M., Gilles, S., Michels, P.A. y Ridgen, D. J. (2006). Autophagy and related process in trypanosomatids: insights for genome and bioinformatics analysis. *Autophagy*, **2**: 107-118.
13. Klionsky, D.J., Cregg, M., Dunn Jr., W.A. y cols. (2003). A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev. Cell*, **5**: 539-545.
14. Kumatzu, M., Waguri, S., Chiba, T., Iwata, Jr., Tanida, I. y cols. (2006). Loss of autophagy in the central nervous system causes degeneration in mice. *Nature*, **441**: 880-884.
15. Levine, B. y Klionsky, D.J. (2005). The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. *J. Cell Sci.*, **118**: 7-18.
16. Malcolm, J., Mac Conville, J. y Nederer, T. (2011). Metabolic pathways required for the intracellular survival of *Leishmania*. *Ann. Rev. Microbiol.*, **6**: 543-546.
17. Monte Neto, J.L., Souza, M.L., Díaz, C.S. y col. (2011). Morphological and physiological changes in *Leishmania* promastigotes induced by yangambin a lignin obtained from *Ocotea duckei*. *Exp. Parasitol.*, **127**: 215-221.
18. Saxena, H., Lahay, T., Holland, N., Aggarwald, G., Huang, Y., Volkpin, H., Myla, P.J. y Zilverstein, D. (2007). Analysis of the *Leishmania donovani* transcriptoma reveals an orderer progression of transient and permanent changes in gene expression during differentiation. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **152**: 53-65.
19. Urdaneta, J. (1989). **Caracterización celular y molecular del proceso de transformación *in vitro* de *Leishmania mexicana***. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela.
20. Williams, R.A., Woods, K.L., Juliano, L. y Coombs, G.H. (2009). Characterization of unusual families of ATYG8 like proteins and ATG12 in the protozoan parasite *Leishmania major*. *Autophagy*, **5**: 159-172.
21. Yan, Z. y Klionsky, D.J. (2009). An overview of the molecular mechanism of autophagy. *Curr. Top Microbiol. Immunol.*, **335**: 1-32.
22. Yorimitsu, T. y Klionsky, D.J. (2005). Molecular machinery for self eating. *Cell Death Diff.*, **12**: 1542-1552.
23. Zilverstein, D. y Shapira, M. (1994). The role of pH and temperature in the development of

Leishmania parasites. **Ann. Rev. Microbiol.**, **48**:
449-470.

Actividad antimicrobiana de *Hibiscus sabdariffa* sobre *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Serratia marcescens*

BEATRIZ ALVEZ, PAOLA MARTÍNEZ Y FABIOLA DUARTE

Laboratorio de Fisiología Genética de Microorganismos. Centro de Biología Celular.
Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela
Calle Suapure, Colinas de Bello Monte. Caracas - Venezuela. Correo: beatriz.alvez@ciens.ucv.ve

Hibiscus sabdariffa, también conocida como Flor de Jamaica, es una planta medicinal con diversos beneficios, usada principalmente en la preparación de bebidas frías y calientes. Estudios previos han demostrado que los extractos de *H. sabdariffa* son efectivos contra diferentes bacterias patógenas. Los microorganismos *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Serratia marcescens* son los agentes causales de enfermedades importantes como conjuntivitis, endocarditis, neumonía, problemas gastrointestinales, infecciones urinarias y nosocomiales. Desde hace muchos años, las bacterias han evolucionado hasta el punto de presentar modificaciones genéticas que les permiten ser resistentes a los antibióticos. Esta situación ha causado alarma a nivel mundial convirtiéndose en una problemática grave de sanidad. Debido a esto, se busca emplear nuevas técnicas que inhiban el desarrollo de estos microorganismos. Por lo tanto, se probaron extractos acuosos y etanólicos de *H. sabdariffa* sobre cepas de *E. coli*, *K. pneumoniae* y *S. marcescens* para demostrar sus propiedades antibacterianas, a través de los métodos de difusión por hoyo, agar y discos de papel, evaluando la inhibición del crecimiento bacteriano. Los resultados indican un efecto inhibitorio en el crecimiento bacteriano al emplear extractos vegetales de *H. sabdariffa*, lo que sugiere un tratamiento alternativo frente a la resistencia de las bacterias a los antibióticos.

Introducción

Hibiscus sabdariffa, también conocida como “Flor de Jamaica”, es una planta medicinal cultivada en Centro América, África y al Sureste de Asia, usada principalmente en la preparación de bebidas frías y calientes. La planta tiene tallos fibrosos y ramas pequeñas, así como cálices de color rojo brillante y de sabor ácido. En la medicina popular, una infusión de los cálices se usa como diurético y para tratar distintas enfermedades, ya que posee propiedades que ayudan en los tratamientos (1,2).

En la actualidad, las bacterias patógenas presentan resistencia contra los antibióticos, lo cual es un riesgo para la salud pública mundial (12). *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Serratia marcescens*, son microorganismos que producen enfermedades importantes para los seres humanos tales como la endocarditis, conjuntivitis, neumonía, problemas gastrointestinales, infecciones urinarias, entre otras (7,9,15). Por lo cual, se están buscando métodos alternos para impedir su colonización y crecimiento.

Diferentes investigaciones han demostrado que *H. sabdariffa* es muy prometedora como agente antimicrobiano. En 2007, se llevó a cabo un estudio donde compararon el efecto antibacteriano de extractos metanólicos de *H. sabdariffa* y del antibiótico Estreptomina, a través del método de difusión en disco, encontrando mayor efectividad con los extractos de la planta sobre *Staphylococcus aureus*, *Bacillus stearothermophilus*, *E. coli*, y *K. pneumoniae* (11). Posteriormente en 2011, se

estudió la actividad antimicrobiana de extractos acuosos y metanólicos de *H. sabdariffa* en aislados de *E. coli* de muestras de alimentos, veterinarias y clínicas, observando inhibición del crecimiento microbiano mediante difusión por agar (4). Así mismo, en 2013, se analizó la actividad antimicrobiana de los extractos de cinco variedades de *H. sabdariffa* contra *S. marcescens*, *Salmonella typhimurium* y *S. choleraesuis*, demostrando la efectividad de extractos acuosos, etanólicos y metanólicos de la Flor de Jamaica como antimicrobiano (10). Asimismo, en 2016, se realizó una investigación donde se comprobó la actividad antimicrobiana de extractos etanólicos de *H. sabdariffa*, sobre *S. marcescens*, *E. coli*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, *B. subtilis* y *Lactobacillus*, empleando el método de difusión por disco (13). Para evaluar la sobrevivencia de 13 bacterias relacionadas con Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA), se aplicaron extractos de *H. sabdariffa* en chiles jalapeños y serranos. Estos ensayos demostraron reducción en los niveles de todas las bacterias: *Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri*, *Salmonella typhimurium*, *S. typhi*, *S. montevideo*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, cinco patotipos de *E. coli* (productora de toxina Shiga, enteropatógena, enterotoxigénica, enteroinvasiva y enteroagregada) y *Vibrio cholerae* O1, donde el tratamiento con extractos de cálices de Flor de Jamaica resultó más eficiente que los tratamientos con hipoclorito de sodio, plata coloidal

y ácido acético en ambos tipos de chiles (14). Debido a la polémica actual, existe gran interés en estudiar este tema, ya que el empleo de extractos vegetales en lugar de antimicrobianos sería una solución factible en el tratamiento de enfermedades causadas por bacterias patógenas, minimizando los riesgos causados por la resistencia de las bacterias contra los antibióticos. Para ello, se prepararon extractos acuosos y etanólicos de *H. sabdariffa*. Mediante los métodos de difusión por hoyo, por agar y por discos de papel, se midió la inhibición del crecimiento de *E. coli*, *K. pneumoniae* y *S. marcescens*, con el objetivo de estudiar la actividad antimicrobiana de los extractos de Flor de Jamaica sobre estas importantes especies bacterianas.

Metodología

Cepas bacterianas

Se emplearon cepas de *E. coli*, *K. pneumoniae* y *S. marcescens* provenientes del Laboratorio de Fisiología y Genética de Microorganismos (LFGM) del Instituto de Biología Experimental de la Universidad Central de Venezuela (IBE-UCV). Las cepas se mantuvieron en medio Luria Bertani o LB (5 g.L⁻¹ extracto de levadura, 10 g.L⁻¹ triptona y 5 g.L⁻¹ cloruro de sodio, 15 g.L⁻¹ agar), a 37°C.

Preparación de extractos vegetales

Se prepararon varias concentraciones pulverizando cálices secos de la planta y colocándolos en matraces de vidrio estériles añadiendo en cada uno el volumen apropiado de H₂Ode (H₂O destilada estéril) o EtOH 90 % (etanol al 90 %) para obtener los extractos acuosos y etanólicos, respectivamente (Tabla 1).

Tabla 1. Concentración de extractos de *H. sabdariffa*

Cálices secos	H ₂ Ode o EtOH 90%	[extracto]
5 g	25 ml	0,2 g.ml ⁻¹
5 g	50 ml	0,1 g.ml ⁻¹
2,75 g	50 ml	0,055 g.ml ⁻¹
8,25 g	25 ml	0,33 g.ml ⁻¹
27,5 g	10 ml	2,75 g.ml ⁻¹

Todas las preparaciones con agua se llevaron a ebullición 10 minutos. Posteriormente, se incubaron a 4°C durante una semana y se filtraron con papel Whatman N° 4, en condiciones de esterilidad.

Aparte, las preparaciones con EtOH 90% se almacenaron a 4°C durante siete días, luego se filtraron igual que los extractos acuosos.

Comprobación de la actividad antimicrobiana

Para confirmar esta propiedad se realizaron los siguientes métodos utilizando suspensiones bacterianas de 1,5x10⁶ UFC.ml⁻¹, las cuales se

sembraron en forma de malla sobre el agar con la ayuda de hisopos estériles:

1) Difusión por hoyo.

Placas de agar LB se dividieron en tres partes, luego se perforaron agujeros en cada sección con ayuda de un sacabocados estéril (Fig. 1). Posteriormente se sembró cada bacteria en las distintas secciones. Cada agujero se rellenó con 60µl de los extractos acuoso y etanólico de concentración 0,33 g.ml⁻¹.

2) Difusión por Agar.

Nuevamente se emplearon placas de agar LB divididas en tres secciones, se colocaron 500µl de cada extracto por placa de concentración 2,75 g.ml⁻¹, distribuyendo mediante rastrillo de vidrio estéril. Luego, se sembró cada bacteria en su sección correspondiente del agar.

3) Difusión por discos de papel.

Cápsulas con agar LB divididas en tres partes, fueron inoculadas con las cepas bacterianas en su sección correspondiente. Posteriormente con discos de papel de filtro Whatman N° 4 de 6 mm de diámetro, previamente esterilizados, se impregnaron en cada uno de los extractos acuoso y etanólico de concentraciones 0,055 g.ml⁻¹, 0,1 g.ml⁻¹ y 0,2 g.ml⁻¹. Finalmente, cada disco se colocó encima de cada zona del agar donde se sembró cada bacteria.

Como control en cada método se sustituyeron los extractos por H₂Ode y EtOH 90%. Se incubaron todos los ensayos a 37°C durante 24 horas. Todas las pruebas se realizaron por duplicado. El esquema de siembra empleado es como se observa en la Fig. 1:

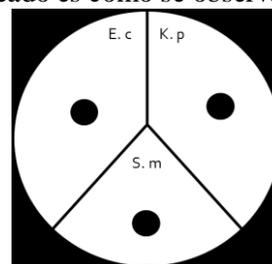


Fig. 1. Esquema de siembra de las bacterias en las placas de agar LB y ubicación de los extractos en los círculos negros en los métodos de difusión por hoyo y discos de papel. En el caso de difusión por agar se distribuyó el extracto en todo el medio. E.c: *E. coli*, K.p: *K. pneumoniae*, S.m: *S. marcescens*.

Resultados y discusión

En la Tabla 2 se presentan los resultados obtenidos para cada método de difusión, con cada bacteria y con cada concentración ensayada, tanto para extractos acuosos como para extractos etanólicos de Flor de Jamaica.

1. Difusión por hoyo

En el extracto acuoso de *H. sabdariffa* a 0,33 g.ml⁻¹ no se observó inhibición de los microorganismos, resultado que puede ser comparado con otras investigaciones (5). Cabe destacar que estos autores inocularon 100µl con una suspensión bacteriana de

10⁶ UFC/ml de *E. coli* y *K. pneumoniae*. Sin embargo, para el caso del extracto etanólico de 0,33 g.ml⁻¹ sí se presentó una reducida inhibición que no pudo ser medible, caso contrario (5), en un estudio del 2003, sí obtuvieron halos definidos y medibles al realizar experimentos para comprobar la actividad antibacteriana de extractos algales. Una diferencia resaltante, es que dichos autores utilizaron doble capa de agar para la prueba, en la primera capa abrieron los agujeros, agregaron los extractos y posteriormente colocaron otra capa de agar con los microorganismos inoculados en ella (8). Igualmente, en una publicación de 2007, se evidenció una inhibición definida en *E. coli*, *K. pneumoniae* y *S. marcescens* (11). Los resultados observados pudieron deberse a que la cantidad de extracto colocado en cada hoyo (0,02g) difundió por debajo, entre el agar y el vidrio, mientras que las cepas fueron sembradas en la superficie superior del agar; por lo tanto, la disponibilidad de extracto fue muy baja para poder visualizar un efecto de inhibición. Esto nos condujo a descartar este método.

Tabla 2. Crecimiento bacteriano en las distintas concentraciones ensayadas de extractos acuosos y etanólicos de *H. sabdariffa* con los distintos métodos de difusión.

Extracto	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>S. marcescens</i>	
Difusión por Hoyo				
A	0,33 g.ml ⁻¹	+	+	+
	H ₂ Ode	+	+	+
E	0,33 g.ml ⁻¹	-	-	-
	EtOH 90%	+	+	+
Difusión por agar				
A	2,75 g.ml ⁻¹	+	+	+
	H ₂ Ode	+	+	+
E	2,75 g.ml ⁻¹	+	+	+
	EtOH 90%	+	+	+
Difusión por discos de papel				
A	0,055 g.ml ⁻¹	+	+	+
	0,1 g.ml ⁻¹	+	+	+
	0,2 g.ml ⁻¹	+	+	+
	H ₂ Ode	+	+	+
E	0,055 g.ml ⁻¹	-	-	-
	0,1 g.ml ⁻¹	-	-	-
	0,2 g.ml ⁻¹	-	-	-
	EtOH 90%	+	+	+

A: acuoso; **E:** etanólico; (+): creció. (-): no creció.

2. Difusión por agar.

Este método depende de la concentración de la sustancia a emplear, así como el método de mezcla con el agar. En algunas ocasiones se realiza premezclando la sustancia con el agar en estado líquido y se sirve en la placa esperando su solidificación para posteriormente inocular los microorganismos. En nuestro caso, se realizó la mezcla vertiendo los extractos en el agar ya solidificado y

distribuyéndolos por la superficie mediante un rastrillo de vidrio estéril, esperando su completa absorción para proceder a la siembra microbiana. Los extractos etanólicos y acuosos de concentración 2,75 g.ml⁻¹ de *H. sabdariffa* no presentaron inhibición. En una investigación del 2011, se comprobó la actividad antimicrobiana de la planta en *S. typhimurium* y *S. choleraesius* al utilizar extractos que poseen proporciones aproximadas a las empleadas en este trabajo (10). De igual manera, en una investigación del 2008, emplearon extractos etanólicos al 60% con el mismo método, pero utilizando extractos de otra planta, comprobando que sí poseen actividad antibacteriana (6). En este ensayo se distribuyó un volumen de 500µl (0,07 g) en la superficie del agar, se esperó su absorción completa y se procedió a la siembra de las bacterias. Los resultados sugieren que dicha cantidad no es suficiente para observar un verdadero efecto inhibitorio sobre el crecimiento bacteriano. Por lo tanto, este método también se descartó.

3. Difusión por discos.

Uno de los análisis microbiológicos más importantes en la actualidad es el antibiograma, que no es más que la prueba estándar de oro para determinar la resistencia o susceptibilidad de un microorganismo patógeno ante distintos antibióticos, con el fin de administrar a los pacientes la medicación adecuada ante una infección. Este método es llevado a cabo empleando discos de papel impregnados en las concentraciones mínimas de antibiótico que se han estimado previamente que se pueden administrar a los pacientes. En las concentraciones etanólicas de *H. sabdariffa* se pudo apreciar inhibición en las bacterias *E. coli*, *K. pneumoniae* y *S. marcescens*. Resultado comparable con el trabajo de un investigador en 2013, donde se pudo apreciar el efecto antimicrobiano de los extractos etanólicos (10). A diferencia de ese estudio, los extractos etanólicos usados en la investigación actual no pasaron por un proceso de evaporación de los residuos de alcohol. Sin embargo, en otro estudio del 2003, donde se probaron extractos etanólicos de diferentes algas, sin evaporar los residuos, demostraron actividad antimicrobiana, al igual que en nuestra investigación (8).

Los extractos acuosos de *H. sabdariffa*, de 0,055 g.ml⁻¹, 0,1 g.ml⁻¹ no presentaron inhibición en ningún caso, resultado comparable con un grupo de investigadores en 2011, cuyo ensayo resultó negativo (5), mientras que a 0,2 g.ml⁻¹ sí se observó inhibición del crecimiento bacteriano (0,002 g) (**Fig. 2**). Así mismo, se debe tomar en cuenta que el medio de cultivo Muller-Hilton es el recomendado para realizar un antibiograma, ya que es un medio rico.

Además, posee componentes que permiten una mejor difusión de las sustancias, a diferencia de otros medios. Por lo tanto, una mejor difusión conduce a una zona de inhibición con mayor definición (3). Sin embargo, en la presente investigación se empleó agar LB, lo cual pudo haber afectado la difusión de los extractos.

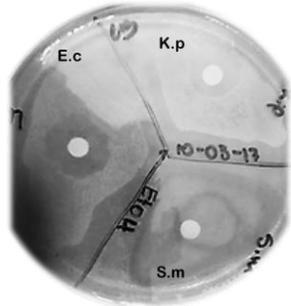


Fig. 2. Método de difusión por discos de papel, impregnados con extracto etanólico a $0,2 \text{ g.ml}^{-1}$

A pesar de los detalles de composición del medio de cultivo y las concentraciones de extractos que pudieran ser probadas, este trabajo representa el primer aporte en Venezuela donde se aplican extractos etanólicos y acuosos de Flor de Jamaica sobre tres bacterias causantes de importantes infecciones. Debido a esto, recomendamos continuar los estudios con distintas concentraciones de extractos etanólicos a partir de diferentes partes de la Flor de Jamaica, que son promisorios para atacar estos microorganismos con sustancias distintas a los antibióticos, a los cuales los microorganismos pueden presentar resistencias, agravando los problemas de salud pública. De igual forma, se deben continuar los estudios con *H. sabdariffa* debido a la importancia que posee tanto para la ciencia como para la cotidianidad de las personas. Es decir, realizar investigaciones para buscar alternativas al uso de una planta de fácil acceso comercial y de uso habitual, causando así que algo que podría llamarse “común” pudiese tener un gran impacto en el mundo de la ciencia por los prometedores efectos que posee.

Referencias

1. Abd Allah, A. y Elsave Saeed, M. (2014). Isolation and antimicrobial activities of protocatechuic acid from *Hibiscus sabdariffa*. Sudan: **Sudan University of Science and Technology**. (Tesis de Maestría).
2. Cid-Ortega, S. y Guerrero-Beltrán, J. (2012). Propiedades funcionales de la jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.). **Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos**, 6: 47 - 63.
3. Cona, E. (2002). Condiciones para un buen estudio de susceptibilidad mediante test de difusión en agar. **Rev. Chil. Infectol.**, 19: 77-81.
4. Fullerton, M., Khatiwada, J., Johnson, J., Davis, S. y Williams, L. (2011). Determination of Antimicrobial Activity of Sorrel (*Hibiscus sabdariffa*). **J. Medic. Food**, 14: 950–956.
5. Jacob, S.P. y Shenbagaraman, S. (2011). Evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of the selected green leafy vegetables. **Int. J. PharmTech Res.**, 3: 148-152.
6. Kareem, S., Akpan, I. y Ojo, O. (2008). Antimicrobial Activities of *Calotropis procera* on Selected Pathogenic Microorganisms. **Afric. J. Biomed. Res**, 11: 105-110.
7. MacFaddin, J. (2003). **Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica**. Educ. Méd. Panam. México, 3480 p.
8. Magallanes, C., Córdova, C. y Orozco, R. (2003). Actividad antibacteriana de extractos etanólicos de macroalgas marinas de la costa central del Perú. **Rev. Per. Biol.**, 10: 125- 132.
9. Molina, J. (2015). *Escherichia coli*. Universidad Nacional Autónoma de México. Disponible en: <http://www.facmed.unam.mx>. Visitado el 04/01/2017.
10. Morales Cabrera, M. (2011). Actividad antimicrobiana y caracterización fenólica de extractos de cálices de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.). Montecillo: **Institución de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas**. (Tesis de Maestría).
11. Olaleye Tolulope, M. (2007). Cytotoxicity and antibacterial activity of Methanolic. **J. Med. Plant Res.**, 1: 009-013.
12. Organización Mundial de la Salud. (2016). Organización Mundial de la Salud. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/>. Visitado el 05/03/2017.
13. Prabhakaran, D., Rajeshkanna, A. y Senthamilselvi, M. (2016). Antimicrobial activity of *Hibiscus sabdariffa* (Flowers). **Indo Amer. J. Pharm. Res.**, 6: 2231-6876.
14. Rangel-Vargas, E., Gómez-Aldapa, C.A., Falfan-Cortes, R.N., Rodríguez-Marín, M.L., Godínez-Oviedo, A., Acevedo-Sandoval, O.A. y Castro-Rosas, J. (2017). Attachment of 13 types of foodborne bacteria to jalapeño and serrano peppers and antibacterial effect of roselle calyx extracts, sodium hypochlorite, colloidal silver, and acetic acid against these foodborne bacteria on peppers. **J. Food Protect.**, 80: 406-413.
15. Romero, R. (2007). **Microbiología y Parasitología Humana**. México: 3ra edición. Educación Médica Panamericana. ISBN: 978-968-7988-48-1. 812 p.

Cordón umbilical humano como fuente de células madre en la bioingeniería tisular

ELIZABETH MERENTES, SILVIA SELVITELLA, ANNA SANCHEZ
Y MARÍA LORENA MÁRQUEZ

Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Biología de Tumores, Instituto de Biología Experimental (IBE).
Universidad Central de Venezuela. Caracas. Correo: emerentes@gmail.com

El cordón umbilical humano (CUH) es una fuente de células madre mesenquimales de naturaleza más primitiva que la de los tejidos adultos; esta propiedad las hace únicas como candidatas a células madre ideales para su potencial uso en la medicina regenerativa. Se ha planteado que estas células madre mesenquimales derivadas del CUH también pueden ser una alternativa como fuente de células para la bioingeniería de tejidos, así como también para la creación de futuros bancos de células que permitan el desarrollo biotecnológico en áreas de biomedicina y veterinaria. En este sentido, en el presente trabajo se aislaron las células del CUH, se establecieron cultivos primarios y luego se realizaron los subcultivos para amplificar la población celular. Algunas poblaciones de células mesenquimales se criopreservaron por vitrificación, determinando que las células mesenquimales conservan su identidad morfológica y capacidad de diferenciación neurogénica después de la descongelación. Estas propiedades son muy importantes para poder establecer en el futuro banco de células madre para su aplicación clínica. Por otra parte, también se determinó el potencial cardiomiogénico mediante el uso de medios condicionados, y sistemas de co-cultivo con células de corazón de fetos; bajo estos microambientes se lograron obtener células con características comparables a fenotipos cardíacos.

Introducción

La investigación en células madre es un tema de gran actualidad debido a las grandes expectativas que se han generado para su utilización en la medicina del futuro. Asimismo, en la Bioingeniería de Tejidos, hoy en día se busca obtener células madre de diferentes fuentes para su uso en la reconstrucción de neotejidos *in vitro* (4). Es importante destacar que este tipo de investigación básica es fundamental para que en un futuro se puedan tener bancos de células y contar con tecnologías adecuadas que pudieran servir de plataforma para su uso potencial terapéutico en pacientes con diferentes patologías, así como también en el área de la veterinaria (1).

Recientemente, se ha demostrado que el cordón umbilical es una fuente rica en células progenitoras mesenquimales y hematopoyéticas. En el año 2003 se realizó el primer aislamiento de células mesenquimales de cordón umbilical humano y se determinó la presencia de varios marcadores moleculares para células madre en las células de la gelatina de Wharton (5). Estas células del cordón umbilical, bajo condiciones apropiadas, tienen un alto potencial de diferenciación hacia distintos linajes (3).

El objetivo de este trabajo fue aislar, cultivar y caracterizar las células madre del cordón umbilical humano. Se determinó el potencial neurogénico *in vitro* de células mesenquimales que fueron criopreservadas por vitrificación. Asimismo, se

determinó su potencialidad de diferenciación cardiomiogénica.

Materiales y métodos

Se procesaron 7 cordones umbilicales obtenidos de placentas humanas provenientes de partos por cesáreas, suministradas por el Dr. Pedro Hurtado de la Clínica Jiménez Rojas, bajo consentimiento informado de las madres gestantes y con la aprobación del Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela y transportados al Laboratorio en condiciones estériles. El cordón umbilical humano se secciona y se lava 3 veces en Solución Buffer de Fosfato libre de calcio y magnesio (PBS).

Para el aislamiento de las células derivadas del CUH, se utilizó una combinación de enzimas, aplicando primero la enzima Dispasa tipo II (1,2 unidades/mL), que actúa a nivel de la membrana basal del epitelio permitiendo separar células epiteliales derivadas del epitelio de recubrimiento del CUH y células mesenquimales provenientes de la región del subamnios (**Fig. 1**). Seguidamente, se usó la enzima colagenasa tipo II a 1mg/mL (actividad 295 unidades/mg) en forma fraccionada separando las células mesenquimales presentes en la gelatina de Wharton (**Fig. 1**).

Las células obtenidas de los diferentes compartimientos del cordón umbilical fueron resuspendidas en medio nutritivo DMEM: F12 suplementado con 15% Suero Fetal Bovino (SFB), 1% antibióticos-antimicótico, 2mM de L-Glutamina

y se sembraron, en placas multipozos 3 x 2, previamente cubiertas con gelatina al 1% como superficie de adhesión, llevado a incubación a 37°C con atmósfera húmeda al 5% de CO₂. Un vez que el cultivo primario alcanza la confluencia, se realizaron los subcultivos para amplificar la población celular, que fueron utilizados para los ensayos de caracterización, criopreservación e inducción de la diferenciación.

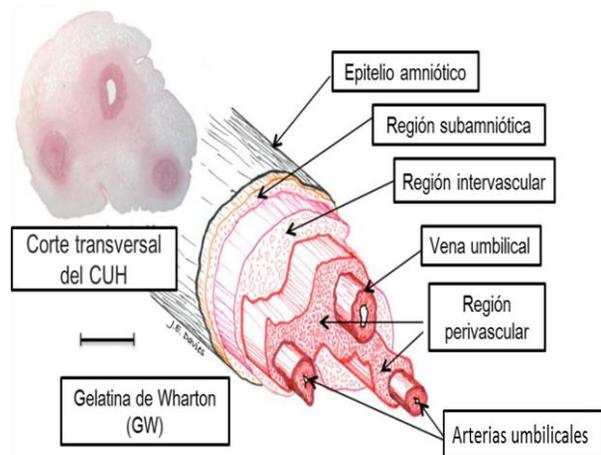


Fig. 1. Diagrama tridimensional de la estructura del cordón umbilical humano. Tomado y modificado de Davies y col. (3).

Caracterización de las células madre mesenquimales (CMM)

Para caracterizar los cultivos de CMM antes y después de la criopreservación, se hicieron observaciones periódicas en el microscopio invertido de fases, acoplado a una computadora con el programa WinTvr3, tomando los registros fotográficos correspondientes. Además, se realizó la coloración de rutina May-Grünwald-Giemsa y la expresión inmunocitoquímica de la vimentina, una proteína del filamento intermedio del citoesqueleto presente en células de origen mesenquimal.

Criopreservación y descongelación celular

La criopreservación por vitrificación, se realizó utilizando una modificación del protocolo de Moon y col. (6). Para esto, se utilizaron dos soluciones: 1) Solución de equilibrio al 20% de Etilenglicol (EG) y 2) Solución de vitrificación al 40% EG, 18% Linfopred y 0,3 M Sacarosa. Las soluciones fueron preparadas en solución PBS con 20% de SFB. Las células se criopreservaron a una alta densidad de 1×10^6 células por criotubo. Las células se resuspendieron en 50 μ L de solución de equilibrio por 5 minutos y luego, se añadieron 500 μ L de solución de vitrificación por 40 segundos.

Posteriormente, la suspensión celular, fue colocada en criotubos de 1,2 mL para la criopreservación, trasladándose directamente al tanque de nitrógeno líquido, para su almacenamiento.

Las células se descongelaron después de un periodo de tiempo entre 2 -9 semanas, colocando los criotubos en baño de María a 37°C. Luego, la suspensión celular fue resuspendida en solución de sacarosa a diferentes concentraciones 0,5 M, 0,25 M y 0 M en PBS con 20% SFB, y sometiendo a centrifugación por 5 minutos a 724,5 g en cada concentración. Pasado el tiempo, fue descartado el sobrenadante y se resuspendió el taco celular en medio DMEM: F12 suplementado. Posteriormente, se evaluó el % de viabilidad celular, con el método de azul de tripano.

Inducción de la diferenciación in vitro de células mesenquimales del cordón umbilical

Para inducir la diferenciación cardiomiogénica, se establecieron cultivos primarios por explantes de cardiomiocitos a partir de corazones de fetos de ratón de 17- 19 días de gestación; así de esta manera se pueden obtener medios condicionados a partir del cultivo celular y además realizar co-cultivos de células madre mesenquimales con cardiomiocitos de fetos de ratón (8). La diferenciación de las células mesenquimales del CUH se evaluó por medio de la morfología celular, la coloración hematoxilina ácida fosfotúngstica que colorea las estriaciones musculares.

En relación a la diferenciación neurogénica, a las células mesenquimales se añadió un medio preinductor por 24 horas que contenía medio base con 20% SFB, 1 mM β -mercaptoetanol, posteriormente se les agregó medio inductor con 2% SFB, 7 mM β -mercaptoetanol por un tiempo máximo de 7 horas.

Se efectuaron registros periódicos al microscopio invertido de fase entre 3 a 7 horas. Para la determinación de la presencia de células canalizadas hacia el linaje neural en los cultivos, se realizó la tinción de violeta de cresilo que permite determinar la presencia de la sustancia Nissl de las células diferenciadas y además se realizaron ensayos inmunocitoquímicos usando un anticuerpo en contra de neurofibrillas tipo M.

Resultados y discusión

La combinación de enzimas dispasa, tripsina y colagenasa tipo II, utilizadas en el trabajo, permitieron el aislamiento de las células madre epiteliales y mesenquimales presentes en los diferentes compartimientos del cordón umbilical humano, principalmente de las regiones subamniótica y de la gelatina de Wharton (**Fig. 2**).

En el establecimiento de los cultivos primarios en monocapa, se logró observar una población celular heterogénea, lo que nos indica que existen subpoblaciones de células con características

intrínsecas del tejido de origen. A pesar de esto, cuando se realizan los subcultivos se logran obtener poblaciones más homogéneas de células de morfología tipo fusiforme que son las consideradas como células madre mesenquimales, logrando expandirlas hasta el séptimo pasaje sin rasgos aparentes de senescencia. Es importante destacar que las células mantuvieron las características morfológicas después del proceso de vitrificación, como se aprecia en la caracterización celular por medio de la coloración de rutina May-Grünwald (Figs. 3A y 3B) y de la expresión de la vimentina, citoesqueleto característico de células progenitoras de naturaleza mesenquimal (Figs. 3C y 3D).

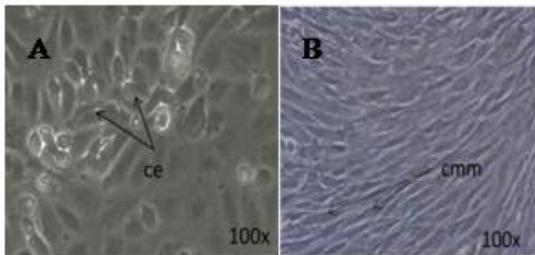


Fig. 2. Cultivo primario de células derivadas del cordón umbilical humano observadas al microscopio invertido de fases. A) Células obtenidas a partir del denudamiento del epitelio de recubrimiento a dos días del cultivo con morfología poliédrica similares a células epiteliales. B) Células derivadas de la gelatina de Wharton a los trece días de cultivo con morfología típica fusiforme.

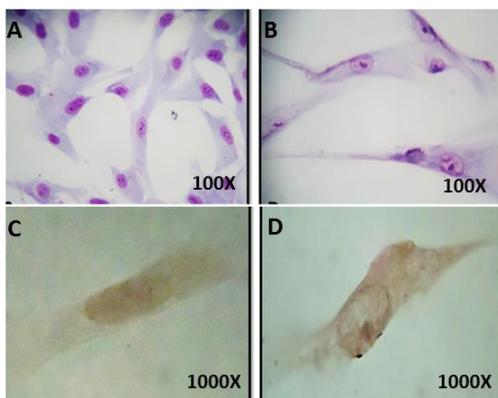


Fig. 3. A-B) Células provenientes de las gelatina de Wharton caracterizadas con May-Grünwald-Giemsa. C y D) Expresión inmunocitoquímica de la vimentina. A y C) Población celular antes de la criopreservación. B y D) Después de la criopreservación.

Diferenciación neurogénica

En presencia de los medios inductores neurogénicos se pudo evidenciar la transformación de las CMM antes y después del proceso de criopreservación hacia el linaje neurogénico, en donde se lograron observar cambios morfológicos evidentes. Las células mostraron extensiones similares a las neuritas derivadas de un cuerpo o soma más denso,

esto debido a que las células retrajeron su citoplasma hacia la región que rodea el núcleo, reflejando células similares a progenitores neuronales: neurona pseudo-unipolares (Fig. 4I), neurona bipolares (Fig. 4C) y piramidales (Fig. 4H), así como también células que se asemejan a células gliales, como: astrocitos (Fig. 4D) y oligodendrocitos (Fig. 4G), a diferencia de las células mesenquimales no inducidas (Fig. 4A).

El marcaje contra el anticuerpo neurofibrillas, permitió corroborar la diferenciación neuronal de las CMM, en donde, las células diferenciadas después y antes de la criopreservación se expresaron positivas ante el marcaje contra la neurofibrillas tipo M (Figs. 4C y 4F, respectivamente), presentando las células una coloración marrón-ámbar en el citoplasma y extensiones neuronales, debido al revelado del marcaje con el cromógeno diaminobencidina.

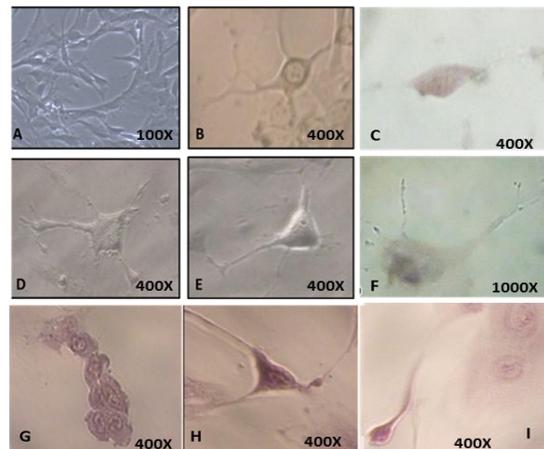


Fig. 4. Diferenciación neurogénica A) Células mesenquimales no-inducidas. B) Control positivo, célula del tejido nervioso del cerebro de ratón. C) Neurona bipolar positiva al inmunomarcaje con neurofilamento. D) Célula similar a astrocito. E) Neurona con soma piramidal. F) Neurona positiva al inmunomarcaje. G) Grupos de células similares a oligodendrocitos. H) Célula similar a neurona con soma piramidal I) Célula similar a neurona unipolar. A,B,D,E) Microscopio de contraste de fases. C y D) Inmunomarcaje con neurofilamento. G, H, I) Coloración violeta de cresilo.

El proceso de criopreservación por vitrificación es un método efectivo y simple que permite que las células mesenquimales del cordón umbilical humano después del proceso de criopreservación por vitrificación, puedan mantener su potencial de proliferación y diferenciación neurogénica (7).

Diferenciación cardiomiogénica

La inducción a linaje cardíaco a través de las estrategias, tanto del uso de medios condicionados (Figs. 4M y 4N) como el establecimiento de sistemas de co-cultivo (Fig. 4L), generaron cambios morfológicos en las células madre mesenquimales, comparables con las células cardíacas aisladas de

corazones de fetos de ratón que se utilizaron como controles positivos (**Fig. 4J** y **Fig. 4K**) como son: morfología cilíndrica con núcleos centrales (n), presencia de miofibrillas detectadas con la coloración PTAH e interacciones transversales célula-célula similares a discos intercalares, además de la expresión de la desmina, que se encuentra en las células musculares (9).

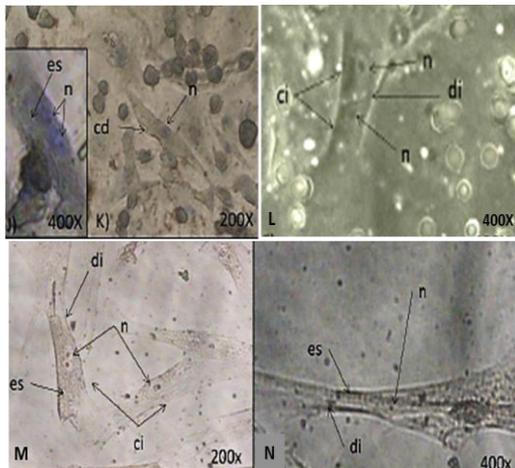


Fig. 4 (Cont.). Diferenciación cardiomiogénica. J-K) Población del explante de corazón donde se pueden observar cardiomiocitos (cd) positivos al marcaje con desmina, en los cuales se aprecia las estriaciones (es). L) Células inducidas en co-cultivos con cardiomiocitos de ratón, donde se puede ver la interacción transversal similar a los discos intercalares (di). 7 días de cultivo. Microscopio de contraste de fases. M) Células inducidas mediante el uso de medios condicionados. Se observan células binucleadas con estriaciones citoplasmáticas. N) Detalle de las estriaciones (es) y presencia de discos intercalares. Coloración PTAH.

Como se puede ver de los resultados obtenidos, se logró inducir las células madre mesenquimales del cordón umbilical humano hacia un linaje mesodérmico, como lo es la diferenciación cardíaca y ectodérmica como las células neurales. Esta potencialidad de diferenciación es importante para fortalecer las nuevas tecnologías de la bioingeniería tisular utilizando el cordón umbilical humano como una fuente alterna de células madre que no requieren de la utilización de procesos invasivos, ya que es un material biológico que se descarta en el momento del parto. Recientemente, se ha planteado que las CMM del CUH pueden ser una fuente importante para terapias neurodegenerativas (2).

Agradecimientos

Parte de este trabajo fue financiado por el proyecto del Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (FONACIT) N° 2015000087.

Referencias

1. Cardoso, T.C., Ferrari, H.F., García, A.F., Novais, J.B., Silva-Frade, C., Ferrarezi, M.C., Andrade, A.L. y Gameiro R. (2012). Isolation and characterization of Wharton's jelly-derived multipotent mesenchymal stromal cells obtained from bovine umbilical cord and maintained in a defined serum-free three-dimensional system. *BMC Biotechnology*, 12: 18.
2. Chen, S., Zhang, W., Wang, J.M., Duan, H.T., Kong, J.H., Wang, Y.X., Dong, M. y colaboradores. (2016). Differentiation of isolated human umbilical cord mesenchymal stem cells into neural. *Int. J. Ophthalmol.*, 9(1): 41-47.
3. Davies, J.E., Walker, J.T. y Keating, A. (2017). Concise review: Wharton's jelly: the rich, but enigmatic, source of mesenchymal stromal cells. *Stem Cells Transl. Med.*, 6(7): 1620-1630.
4. Merentes, E. (2009). Fuentes de obtención de células madre mesenquimales. Potencialidad de diferenciación *in vitro*. Trabajo de Ascenso a Titular. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
5. Merentes, E., Márquez, M.L., Navarro E., López R., González-Terán E. (2014). Fuentes de células para la bioingeniería de tejidos. *MIBE*, 7: 37-40.
6. Mitchell, K.E., Weiss, M.L., Mitchell, B.M., Martin, P., Davis, D., Morales, L., Helwig, B. y colaboradores. (2003). Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia. *Stem Cells*, 21(1): 50-60.
7. Moon, J.H., Lee, J.R., Jee, B.C., Suh, C.S., Kim, S.H., Lim, H.J. y Kim, H.K. (2008). Successful vitrification of human amnion-derived mesenchymal stem cells. *Hum. Reprod.*, 23(8): 1760-1770.
8. Sánchez, A. (2018). Caracterización y potencialidad de diferenciación neurogénica de células madre mesenquimales del cordón umbilical humano criopreservadas por vitrificación. Trabajo Especial de Grado. Escuela de Biología. Universidad Central de Venezuela.
9. Selvitella S. (2016). Diferenciación cardiomiogénica *in vitro* de células madre mesenquimales aisladas del cordón umbilical humano. Trabajo Especial de Grado. Escuela de Biología. Universidad Central de Venezuela.

Efecto de la combinación del 4-metilpiridilquinolina y N-acetil *strychnosplendine* sobre células de cáncer de páncreas humanos (PANC-1): Estudio “*in silico*” y modelaje molecular

FELIPE SOJO^{1,2}, FRANCISCO ARVELO^{1,2}, ALÍRICA I. SUÁREZ³, VLADIMIR V. KOUZNETSOV⁴, MAYRA ROBLES-CASTELLANOS⁴, FERNANDO A. ROJAS-RUIZ⁴, ANGEL ROMERO^{5,6} Y CARLOS CIANEGHEROTTI⁶

¹Fundación Instituto de Estudios Avanzados-IDEA

²Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Biología de Tumores, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. Correo: felipesojo@gmail.com

³Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela

⁴Laboratorio de Química Orgánica y Biomolecular, Universidad Industrial de Santander, Parque Tecnológico Guatiguara, Km 2 vía refugio, Piedecuesta, A.A. 681011, Bucaramanga, Colombia

⁵Laboratorio de Química Medicinal y Heterociclos, Departamento de Química, Edificio de Química y Procesos, Universidad Simón Bolívar, Valle de Sartenejas, Apartado 89000, Baruta, Caracas 1080-A, Venezuela

⁶Cátedra de Química General, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela

El cáncer de páncreas es uno de los más letales, siendo la cuarta causa de muerte, por su dificultad de detección en estadios temprano. Además, la resistencia innata ha sido uno de los principales problemas en el tratamiento con la quimioterapia. La búsqueda de nuevas moléculas con actividad antitumoral como las quinolinas, piridinas y de metabolitos biológicamente activos de plantas usadas en la medicina tradicional venezolana forman parte de un amplio arsenal de drogas antitumorales contra este tipo de tumor. En este sentido, determinamos la actividad “*in vitro*” del 4-metilpiridilquinolina (compuesto sintético) y el N-acetil *strychnosplendine* (producto natural) sobre la línea tumoral de cáncer de páncreas humano (PANC-1) mediante ensayos de MTT, tanto en forma individual como en combinación. Se observó un efecto antitumoral en ambos casos, siendo las combinaciones las que exhiben una mayor actividad biológica, mostrando un fuerte sinergismo. Estos resultados indican una alternativa en el tratamiento quimioterapéutico. Las moléculas estudiadas “*in silico*” mostraron poseer biodisponibilidad y permeabilidad a la membrana según la regla de Lipinski's. El estudio mediante el docking, mostró una alta posibilidad de interacción con el sitio activo de la tubulina, lo que sugiere un posible mecanismo de acción de ambas moléculas.

Introducción

El cáncer pancreático es uno de los más mortales, con un incremento de incidencia y considerada la cuarta causa de muerte conocida por cáncer (2); en parte se debe a la dificultad de detección del cáncer de páncreas en sus estadios tempranos donde la cirugía y otros tratamientos son efectivos (13,17). Además, la resistencia-droga innata o adaptada, ha sido el mayor obstáculo en la quimioterapia en el cáncer de páncreas (8,12). La malignidad inducida por los cambios en la glicosilación de las proteínas, tales como N-glicosilación y la O-glicosilación, influye directamente en las funciones de las proteínas en sus múltiples vías y puede influir en la proliferación, invasión y viabilidad celular del cáncer, así como, en las interacciones con el microambiente del tumor (1,9). Así, la búsqueda en diseño y síntesis de nuevas moléculas con actividad antitumoral que estén constituidas por quinolinas y piridinas están presentes en un amplio número de drogas antitumorales y han formado parte de este

estudio (3,4). Un grupo de nuevas C-6 sustituidas 4-metil-2-(2-, 3- y 4-piridinil) quinolinas fueron evaluadas en las diferentes líneas de cáncer humana, mostrando su gran potencial antitumoral (5). Por otra parte, muchas de las especies de la flora venezolana han sido de utilidad en la medicina tradicional, por sus propiedades antiinflamatorio, analgésico, hipoglicemiante, antibacteriana, leishmanicida, antifúngico y antitumoral (11,14,15), así como algunos de sus frutos (10), lo que conduce a la búsqueda de nuevos metabolitos o productos naturales extraídos de cortezas, hojas, tallos y/o flores y la síntesis de nuevas moléculas partiendo de estructuras bases acompañadas de grupos funcionales con una posible actividad biológica antitumoral.

En vista, del gran potencial que prometen estas moléculas y la dificultad del tratamiento y quimioterapia para el cáncer pancreático, nos planteamos como objetivo en este trabajo evaluar

dos moléculas, el 4-metilpiridilquinolina, compuesto sintético (MR5) y el N-acetil *strychnosplendine* (Nacetil), producto natural (**Fig. 1**) individualmente y en combinación, determinando su capacidad sinérgica como un posible tratamiento que evada la alta resistencia a drogas por parte de este tipo de cáncer.

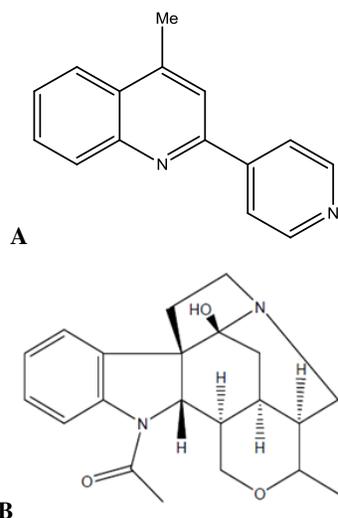


Fig. 1. Estructuras del compuesto sintético y el producto natural. A) 4-metil piridinil quinolina, B) N-acetil *strychnosplendine* (tomado Kouznetsov y col., 2017; Suárez y col., 2016).

Actividad biológica

Los compuestos fueron evaluados en la línea tumoral de cáncer de páncreas humano (PANC-1), mediante los ensayos de MTT (7) de manera individual por 48 horas para determinar la concentración inhibitoria 50% (IC_{50}) sobre la población celular, encontrando que ambas moléculas tiene un efecto biológico, siendo la actividad citotóxica del MR5 más efectiva con un IC_{50} de $23,65 \pm 1,1 \mu\text{g/mL}$ ($92,64 \mu\text{M}$), mientras que para el Nacetil fue de $149,5 \pm 1,13 \mu\text{g/mL}$ ($364,14 \mu\text{M}$). Una vez determinados los valores de IC_{50} para cada compuesto, procedimos a realizar las combinaciones respectivas. La primera combinación planteada fue: MR5 + Nacetil; donde el MR5 está a concentraciones crecientes versus concentración fija del Nacetil (IC_{50}) y una segunda combinación: Nacetil + MR5; donde el Nacetil está a concentración creciente versus concentración fija de MR5 (IC_{50}). Se demostró que ambas combinaciones presentaron mejor actividad biológica sobre la línea tumoral PANC-1 que su efecto individual, mostrando un mayor efecto citotóxico la segunda combinación Nacetil + MR5, con un valor de $3,52 \times 10^{-5} \pm 1,42 \mu\text{g/mL}$ ($8,6 \times 10^{-5} \mu\text{M}$) y de $0,11 \pm 1,36$ ($0,44 \mu\text{M}$), respectivamente (**Fig. 2**).

Análisis de interacción de las combinaciones

Las células fueron incubadas simultáneamente con MR5 y Nacetil por 48 horas. La naturaleza de las interacciones entre el compuesto MR5 y el producto Nacetil fueron analizados con la ayuda de los isobogramas descritos por Tallarida (16). Las dosis obtenidas de cada compuesto actuando solos sobre la línea PANC-1 son representados en los eje X e Y y la línea de aditividad es representada por la unión de estos dos puntos. La dosis de combinación o dosis efectiva (DE), determina la evaluación cuantitativa matemática de la interacción farmacológica de los compuestos, su localización próximo o sobre la línea de aditividad representa un efecto aditivo ($\gamma = 1$) y por debajo o por encima de esta representa un sinergismo ($\gamma < 1$) o antagonismo ($\gamma > 1$), respectivamente. Ambas interacciones, producto de las dos combinaciones realizadas, resultaron ser menores a 1, lo que nos indica que ambas interacciones potencian una a otra ($\gamma < 1$), mostrando un sinergismo fuerte, siendo la interacción Nacetil + MR5 más potenciada. Es decir, el MR5 potencia el efecto del Nacetil sobre las células de páncreas humano (**Fig. 3**).

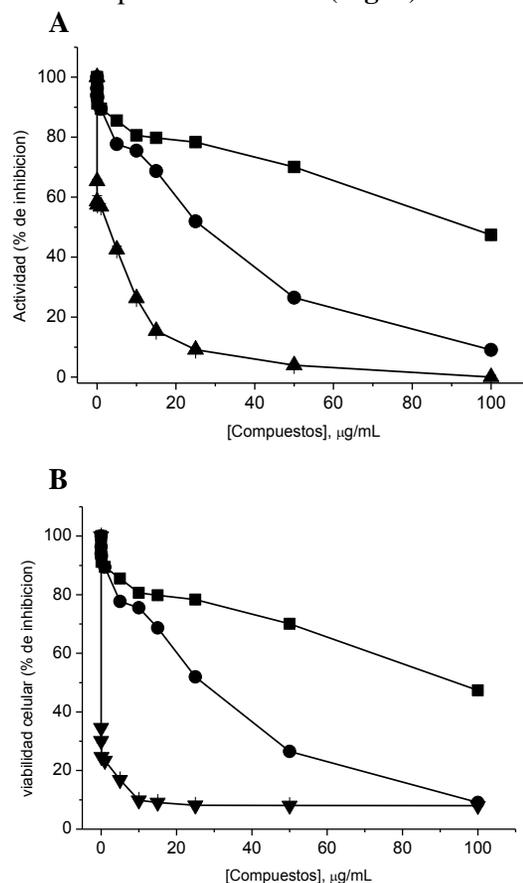


Fig. 2. Efecto del 4-metil piridinil quinolina, N-acetil *strychnosplendine* y sus combinaciones sobre las células de cáncer de páncreas (PANC-1). A) Nacetil (■), MR5 (●), MR5 + Nacetil (▲). B) Nacetil + MR5.

Evaluación “in silico” de las moléculas MR5 y Nacetil

La tecnología del modelo de simulación “in silico” permite el descubrimiento de nuevos fármacos, mediante la química computacional y biológico, para obtener una predicción farmacocinética (vida media, biodisponibilidad, permeabilidad a la membrana, volumen de distribución, depuración). Estos comprenden las bases de datos, la relación cuantitativa entre la estructura y la actividad (QSAR), ofreciendo como ventaja su alta tasa de resultados en el contexto de un costo razonable complementado con evaluaciones farmacodinámicas y toxicológicas. En este orden, las moléculas MR5 y Nacetil fueron evaluadas con el programa *Molinspiration*, arrojando que ambas moléculas no violan la regla de *Lipinski’s*, la cual describe las propiedades moleculares relacionadas a la farmacocinética en humanos, tales como la absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME) (6). Éstas poseen peso molecular menor a 500g/mol, un valor de coeficiente de partición *LogP* menor a 4, son donadoras y aceptores de protones, indicando una buena biodisponibilidad oral y permeabilidad a la membrana.

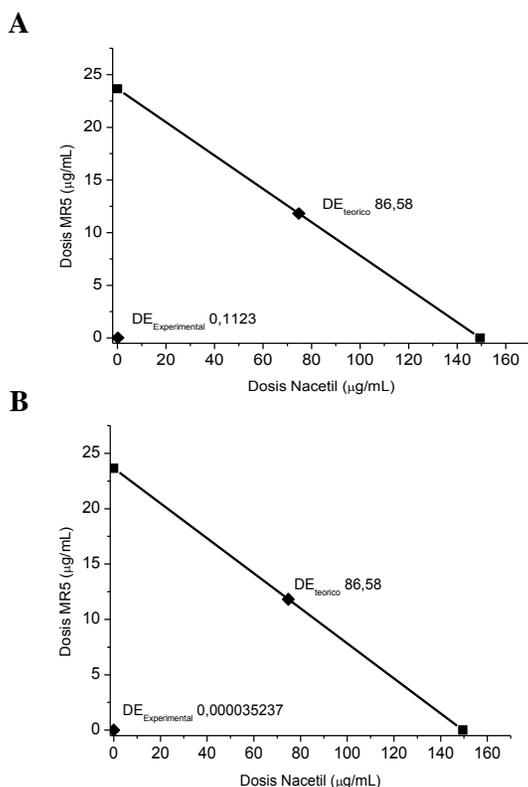


Fig. 3. Isobogramas de las combinaciones del 4-metil piridinil quinolina y el N-acetil *strychnosplendine* sobre las células de cáncer de páncreas (PANC-1). **A)** MR5 + Nacetil. **B)** Nacetil + MR5. DE_{teórica} (Dosis efectiva teorica), DE_{experimental} (Dosis efectiva experimental).

Estudio de modelaje molecular de las moléculas MR5 y Nacetil

El modelaje molecular predice la conformación favorecida de una molécula, al estar unida a otra, a fin de formar un complejo estable y conociendo dicha orientación, puede ser usada para predecir la fuerza de la asociación o la afinidad de enlace entre dos moléculas. El acoplamiento se realiza con la estructura de una proteína, la cual ha sido determinada por cristalografía de rayos X o por espectroscopía de resonancia magnética nuclear, que se encuentra depositada en el Banco de Datos de Proteínas (Protein Data Bank). El estudio de interacción del MR5 y del Nacetil con el sitio de unión de la colchicina en la tubulina muestra muy buena estabilidad en el bolsillo de interacción, determinada por la energía de enlaces formados por los puentes de hidrógenos con los residuos de Cys668, Asn110, Cys668, Leu682, siendo la molécula de Nacetil la que presenta mejor interacción con todos los residuos con los que interacciona la colchicina, con una energía de enlace de -9,66 Kcal/mol (**Fig. 4**). Estos resultados nos permiten predecir que el Nacetil actúa como la colchicina, un inhibidor clásico de la tubulina, y podría ser éste uno de los posibles mecanismos de acción que se inician en las células tumorales de páncreas humano.

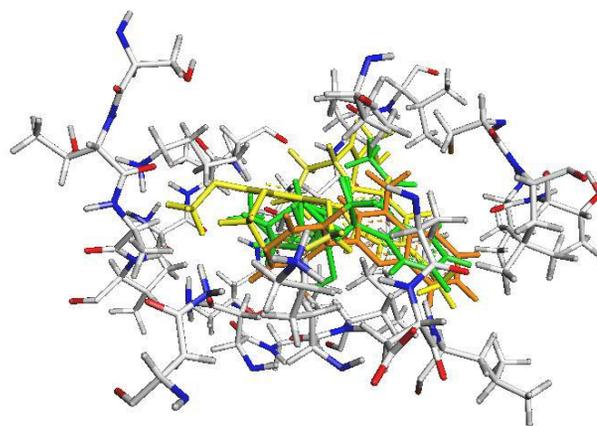


Fig. 4. Representación enzima-ligando de la Colchicina, MR5 y el Nacetil en el sitio activo de la tubulina. Colchicina (amarillo), MR5 (naranja) y Nacetil (verde).

Referencias

1. Arvelo, F., Sojo, F., Cotte, C. (2016). Cancer and Metastatic Substrate **Ecancermedalscience**, 10:701 DOI: 10.3332/ecancer.2016.701.
2. Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J. y Thun, M.J. (2009). Cancer statistics, 2009, CA. **Cancer Journal for Clinicians**, 59(4): 225–249.

3. Kouznetsov, V.V., Merchan Arenas, D.R., Arvelo, F., Bello Forero, J., Sojo, F. y Muñoz, A. (2010). 4-Hydroxy-3-methoxyphenyl substituted 3-methyl-tetrahydroquinoline derivatives obtained through imino Diels-Alder reactions as potential antitumoral agents. **Letter in Drug Design & Discovery**, **7**: 632-639.
4. Kouznetsov, V.V., Sojo, F., Rojas-Ruiz, F.A., Merchan-Arenas, D.R. y Arvelo, F. (2016). Synthesis and cytotoxic evaluation of 7-chloro-4-phenoxyquinolines with formyl, oxime and thiosemicarbazone scaffolds. 16 August 2016 by Springer in **Med. Chem. Res.**; doi:10.1007/s00044-016-1688-6.
5. Kouznetsov, V.V., Robles-Castellanos, M.L. Sojo, F., Rojas-Ruiz, F.A. y Arvelo, F. (2017). Diverse C-6 substituted 4-methyl-2-(2,3-and4-pyridinyl) quinolines: synthesis, in vitro anticancer evaluation and in silico studies. **Med. Chem. Res.** 2017; DOI 10.1007/s00044-016-1775-8.
6. Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W. y Feeney, P.J. (1997). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, **23**: 3-25.
7. Mosmann, T.J. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, **65**: 55-63.
8. Páez, D., Labonte, M.J. y Lenz, H.J. (2012). Pancreatic cancer: medical management (novel chemotherapeutics). **Gastroenterol Clin. North Am.**, **41**: 189-209.
9. Pan, S., Brentnall, T.A. y Chen, R. (2016). Glycoproteins and glycoproteomics in pancreatic cancer. **World J. Gastroenterol.**, **22**(42): 9288-9299.
10. Raybaudi-Massilia, R., Suárez, A.I., Arvelo, F., Zambrano, A., Sojo, F., Calderón-Gabaldón, M.I. y Mosqueda-Melgar, J. (2017). Cytotoxic, Antioxidant and Antimicrobial Properties of Red Sweet Pepper (*Capsicum Annum* L. var. Llanerón) Extracts: In Vitro Study. **International Journal of Food Studies**, **6**: 222-223.
11. Rojas, J.C., Buitrago, A.A., Arvelo, F.A., Sojo, F.J. y Suarez, A.I. (2017). Cytotoxic activity of different polarity fractions obtained from methanolic extracts of *Vismia baccifera* and *Vismia macrophylla* (Hypericaceae) collected in Venezuela. **J. Pharm. Pharmacogn. Res.**, **5**: 320-326.
12. Siegel, R., DeSantis, C., Virgo, K., Stein, K., Mariotto, A., Smith, T., Cooper, D., Gansler, T., Lerro, C., Fedewa, S., Lin, C., Leach, C., Cannady, R.S., Cho, H., Scoppa, S., Hachey, M., Kirch, R., Jemal, A. y Ward, E. (2012). Cancer treatment and survivorship statistics, 2012. **CA Cancer J. Clin.**, **62**: 220-241.
13. Siegel, R., Naishadham, D. y Jemal, A. (2013). Cancer statistics, 2013. **CA Cancer J. Clin.**, **63**: 11-30.
14. Suárez, A.I., Manceboa, M., Delle Monacheb, F., Tirric, M.M., Sojo, F., Arvelo, F. y Tillett, S. (2016). A new indole-alkaloid and a new phenolic-glycoside with cytotoxic activity from *Strychnos fendleri*. **Natural Product Research**. DOI: 10.1080/14786419.2015.1019351.
15. Suárez, A.I., Taddei, A., Sojo, F. y Arvelo, F. (2014). Diterpenos bioactivos de *Croton malambo* Karst. **Revista de la Facultad de Farmacia de la UCV**, **77** (1): 8-15.
16. Tallarida, R.J. (2012). Revisiting the Isobole and Related Quantitative Methods for Assessing Drug Synergism. **J. Pharm. and Experimental Therapeutics**; <http://dx.doi.org/10.1124/jpet.112.193474>.
17. Vincent, A., Herman, J., Schulick, R., Hruban, R.H. y Goggins, M. (2011). Pancreatic cancer. **Lancet**, **378**: 607-620.

Estudio del efecto de compuestos naturales y sintéticos con actividad anti-tumoral sobre las corrientes de K^+ en líneas celulares de cáncer de mama

CHRISTIAN CALDERÓN¹, FELIPE SOJO^{2,3}, ANGEL ROMERO⁴, FRANCISCO ARVELO^{2,3},
FERNANDO GONZÁLEZ¹ Y ANTONIO GUTIERREZ¹

¹Laboratorio de Fisiología y Biofísica del Centro de Biología Celular

²Centro de Biociencias, Fundación Instituto de Estudios Avanzados-IDEA

³Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Biología de Tumores

Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela

Calle Suapure, Colinas de Bello Monte. Caracas – Venezuela.

⁴Laboratorio de Química Medicinal y Heterociclos, Departamento de Química, Edificio de Química y Procesos, Universidad Simón Bolívar, Valle de Sartenejas, Apartado 89000, Baruta, Caracas 1080-A, Venezuela

Correo: christian.calderon@ciens.ucv.ve

El cáncer consiste en un conjunto de enfermedades caracterizadas por la inestabilidad genética, rasgo que puede dar lugar a aberraciones en el proteoma y la consiguiente defeción funcional. Así, entre varios tipos de proteínas de membrana expresadas de esta manera, se encuentran los canales iónicos. En particular, algunos canales de K^+ típicos de células excitables se encuentran en tipos celulares no excitables como en el carcinoma ductal de mama. Estas actividades proteicas le confieren a la célula tumoral unas propiedades fisiológicas a nivel celular y molecular relacionadas con el comportamiento patológico típico, p.e., proliferación descontrolada, evasión de apoptosis, capacidad metastásica, etc. Se ha encontrado que los compuestos que inhiben la actividad de los canales iónicos también afectan estas propiedades fisiológicas y por ende la viabilidad de las células tumorales. En el presente trabajo se evidencia que un compuesto derivado de la estructura 1,2,4-triazolo [3,4-a] ftalazina (TrPh) con actividad antitumoral también inhibe la actividad de canales dependientes de voltaje, como lo evidencian las corrientes de K^+ con rectificación hacia afuera. Aunque no se sabe en qué medida la actividad antitumoral se debe al efecto sobre estos canales, esta evidencia es relevante dados los antecedentes.

Introducción

El cáncer es la segunda causa de muerte en el mundo (4). Para el año 2017 se estimó un incremento 15% del cáncer en Venezuela, y un incremento del cáncer de mama con 6 decesos más por cada 100.000 personas, siendo éste el de mayor incidencia en mujeres entre 45–54 años (19). Particularmente, el cáncer de mama se ha estado combatiendo mediante quimioterapia sobre receptores hormonales y con agentes citotóxicos (26). Entre los agentes citotóxicos con actividad antitumoral preclínica se encuentran varias compuestos naturales y sus derivados semi-sintéticos con mecanismos de acción como: efectos sobre la tubulina (paclitaxel, SPIKET, COBRA) (14,21), inhibición de la topoisomerasas (camptothecin, etoposide) constituyendo agentes antimetabólicos entre otros (14), o inhibidores de proteínas kinasas, entre otros blancos intracelulares, confirmando actividad antimetabólica y pro-apoptótica (22,25).

Los derivados de 1,2,4-triazolo [3,4-a] ftalazina (TrPh) tienen actividad antitumoral en líneas celulares de cáncer, incluida la correspondiente al cáncer de mama con receptor de estrógenos MCF-7. Los

experimentos de citometría de flujo muestran detención del ciclo celular en G2/M en la línea celular EC-9706 de carcinoma esofágico, con una IC50 en el intervalo entre [2 - 4,5] μM (24), y efectos sobre Topoisomerasa II a concentraciones superiores a 19,4 μM (10). Más recientemente, se ha demostrado que estos derivados podrían tener actividad anticancerosa con una IC50 en MCF-7 entre [8,8 - 44,3] μM ; incidiendo sobre el receptor de factor de crecimiento VEGFR-2 con IC50 en un intervalo entre [0,1- 1] μM (7). Sin embargo, es inconveniente que estas sustancias deban atravesar la membrana plasmática, por lo que recientemente se ha tomado como estrategia apuntar a proteínas de la membrana plasmática involucradas con la proliferación. Por ejemplo, la actividad de los receptores tirosina kinasas tipo 1 se ha podido inhibir con anticuerpos o compuestos sintéticos (6), mientras que se han usado productos naturales para inhibir transportadores de múltiples drogas, que confieren resistencia a través del eflujo de agentes quimioterapéuticos (5). Asimismo, los estudios sobre la inhibición de canales iónicos se muestran promisorios para futuras terapias (1), dadas algunas ventajas: además de ser accesibles

desde medio externo, se conocen baterías grandes de inhibidores para estudiarles, juegan un papel importante, entre otros, al determinar el potencial de reposo, en la proliferación, la apoptosis y regulación del volumen celular (20). No obstante, las múltiples funcionalidades además de la ubicuidad en varios tejidos son un problema grave para poder usarlos como blanco con inhibidores ya conocidos, por lo que los estudios en pro del diseño de nuevas sustancias inhibitoras selectivas contra la funcionalidad de los canales en el tejido canceroso son determinantes para hallar agentes terapéuticos (1,9). Varios estudios aplicando inhibidores sintéticos, o bloqueadores de la expresión, de canales en líneas celulares tumorales han permitido revelar la importancia de los mismos para la apoptosis, migración y la consecución del ciclo celular (8,27).

De hecho, se ha reportado la presencia de varios canales de K^+ activados por voltaje (K_v) en tejido o líneas celulares de cáncer de mama (15,17); algunos de ellos se expresan en la mayoría de los tumores humanos, en contraste con su distribución restringida en tejidos sanos. Además, la inhibición de la expresión o actividad conduce a una reducción de la proliferación de las células cancerosas, lo que los convierte en un blanco potencial contra el cáncer (12,18). Por ejemplo, $K_v10.1$ se expresa en más del 70% de los tumores humanos, donde parece estar involucrado en la proliferación celular, supervivencia, angiogénesis, migración, apoptosis y la invasión (17,23). En este estudio se evaluó la actividad de un compuesto derivado de TrPh sobre las corrientes de potasio en la línea celular MCF-7. Previamente, el compuesto evaluado (**Fig. 1**) mostró un IC_{50} óptimo cerca de $0,5 \mu M$ sobre la proliferación en dos líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y SKBr-3. Este efecto se evaluó mediante la técnica de Patch Clamp de célula completa usando cuatro veces la IC_{50} después del crecimiento; esto ayuda a explorar el efecto a concentraciones con un grado de inhibición del crecimiento cercano al 100% en una célula que podría expresar diferentes cantidades del canal dependiendo de la fase del ciclo celular (16).

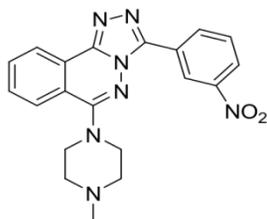


Fig. 1. Derivado de TrPh: 3-(3-Nitrophenyl)-6-(4-methylpiperazin-1-yl)-1,2,4-triazolo[3,4-] Phthalazina (8d).

Materiales y métodos

La técnica de Patch Clamp en configuración de célula completa permite la continuidad entre el citoplasma

de la célula y la solución en una pipeta elaborada con un capilar de borosilicato. El capilar, con diámetros interno y externo de 1,1 y 1,5 mm, respectivamente, se adelgaza mediante calentamiento usando un halador de capilares P-97 de SUTER INSTRUMENT; el diámetro interno de la punta resultó entre 1 y $3 \mu m$. Posteriormente, la punta de la pipeta se pule por calentamiento mediante una microforja Narishige®. Las pipetas se llenaron con una solución que contenía las siguiente composición (mM): 140 KCl, 1 $MgCl_2$, 1,32 $CaCl_2$, 10 HEPES, 2 EGTA, 5 Glucosa, con un pH 7,2 ajustado con KOH y se lleva la osmolaridad a 300 mOsm con manitol; el calcio libre calculado, con un software on line basado en “Maxchelator”, fue 500 nM (3,26). La solución externa contenía en (mM): 3 KCl, 3 KOH, 1 $MgCl_2$, 2 $CaCl_2$, 10 HEPES, 5 Glucosa, con un pH 7,4 ajustado con KOH y se llevó la osmolaridad a 310 mOsm con manitol.

El extremo no adelgazado de la pipeta se introduce en el receptáculo con un electrodo de Ag/AgCl conectado al amplificador Axopatch 200 A, de Axon Instruments® (AI). El rango de resistencias de las pipetas estuvo entre 3 - 5 $m\Omega$. Los datos se colectaron con un convertidor AD/DA (Digidata 1200, USA) y se guardaron digitalmente, mediante el programa pClamp® 8.0 de AI. Este programa también se usó para producir los protocolos de voltaje controlado como sigue: las células se mantuvieron la mayor parte del tiempo en $-50 mV$, la estimulación se produjo con pulsos de prueba de 20 mV durante 300 ms en un intervalo de -110 a 70 mV, y el intervalo entre estímulos fue de 1 s. En cada experimento se esperó 5 min después de la configuración de célula completa antes de la secuencia de estimulación control. Posteriormente, se agregó el compuesto de prueba y se esperó entre 3 y 6 min a que el efecto sobre las corrientes se estabilizara antes de activar el protocolo de estimulación.

Las células se sembraron a una densidad de 10^3 células/mL en cubreobjetos rectangulares de $4 \times 5 mm$. Se incubaron por 24 horas a $37^\circ C$, con medio D-MEM, 10% Suero Fetal Bovino, 1% de coctel de antibióticos (Penicilina, Estreptomocina, Anfotericina B), en atmosfera con 95% de humedad, 5% CO_2 . Posteriormente, el cubreobjetos se colocó en un prototipo de cámara experimental con sistema de perfusión impulsado peristálticamente.

Análisis de datos

Se midió el curso temporal de corriente y de allí se tomó la amplitud al final del pulso para construir curvas de corriente VS voltaje (IVs). Estas curvas fueron normalizadas dividiendo las amplitudes mencionadas por la correspondiente a 70 mV. Cada punto corresponde a una media \pm desviación estándar (DE). Estos datos se analizaron mediante ClampFit®

8.0 de AI y SciDAVis (freeware para graficación y análisis).

Resultados y discusión

En la **Fig. 2** se observan los cursos temporales de corriente en la línea celular MCF-7 como respuesta a un pulso de protocolo con amplitud de 70 mV. Los trazos delgados corresponden a los controles de dos réplicas y los trazos gruesos corresponden a las corrientes afectadas por el compuesto probado (8d). En ambos experimentos se observan las distintas amplitudes de las corrientes debidas a la heterogeneidad en la cantidad y tipo de canales de K^+ expresados. En trazos gruesos se evidencia la disminución en la amplitud y la pérdida importante de la fase transitoria en el curso temporal propia de la activación de canales voltaje-dependientes.

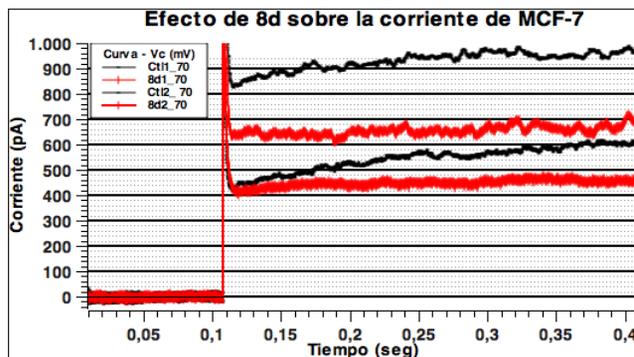


Fig. 2. Cursos temporales de corriente control (trazo delgado) y con 2 μ M del compuesto probado (8d; trazo grueso).

La **Fig. 3** corresponde a la relación I-V, en la que se puede observar el control (rectángulos pequeños) y el efecto del compuesto (8d; 2 μ M) con la línea inferior (rectángulos grandes). Se observa la inhibición de la corriente de potasio en MCF-7, efecto similar al correspondiente sobre la línea celular SKBr-3 (no mostrado).

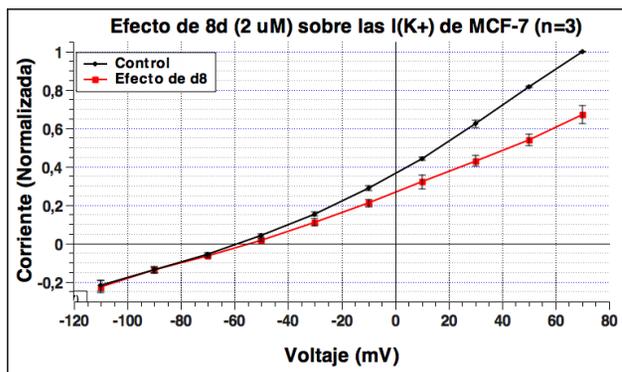


Fig. 3. Curva I-V producida tomando un promedio del valor observado en el curso temporal de la corriente al final del pulso de prueba. La curva oscura corresponde al control (cuadrados pequeños) y la clara (cuadrados grandes) al efecto de 2 μ M del compuesto (8d).

Solo hay inhibición en la parte despolarizante de ambas curvas: eso es significativo para potenciales > -10 mV para MCF-7. El porcentaje de inhibición, medido a 70 mV, es cercano en ambas líneas celulares: en particular MCF-7 [$33 \pm 4,6$] % y en SKBr-3 [$35 \pm 5,9$] %. Se buscó un amplio intervalo de voltaje observar los posibles efectos sobre distintos tipos de canales de K^+ potencialmente presentes. La actividad de los canales de potasio dependientes del voltaje (K_v) depende del valor del potencial de despolarización eléctrica que se impone a través de la membrana biológica en líneas celulares cancerosas, esto explica los transitorios de corriente a estos potenciales (11,13). Así, se encuentra una inhibición justo en la parte despolarizante de la curva con una diferencia evidente a voltajes más positivos que 20 mV. Aunque este no es el intervalo fisiológico de voltaje, podría haber efectos no canónicos de esta inhibición de canal según algunos reportes: "el papel de ciertos canales K^+ activados por voltaje, como $K_v11.1$ (también conocido como $hERG1$) se puede atribuir en gran medida a la modulación de la adhesión celular a la matriz extracelular (MEC). $K_v11.1$ ejerce efectos reguladores pleiotrópicos al formar complejos multiproteicos en la membrana con receptores de integrinas tanto en leucemias mieloides agudas (AML) como en leucemias linfoblásticas agudas (ALL)" (2). Próximos estudios ayudarán a determinar cuáles de estos canales están involucrados, la contribución de estos canales de K_v al potencial de reposo y, finalmente, su participación posterior en el ciclo celular u otros fenómenos relacionados con la viabilidad.

Referencias

1. Arcangeli, A. y Becchetti, A. (2015). Novel perspectives in cancer therapy: Targeting ion channels. *Drug Resist Updat Rev Comment Antimicrob Anticancer Chemother.*, 21-22: 11-19.
2. Arcangeli, A., Pillozzi, S. y Becchetti, A. (2012). Targeting ion channels in leukemias: a new challenge for treatment. *Curr. Med. Chem.*, 19: 683-696.
3. Ca/Mg/ATP/EGTA Calculator v1 constants from Theo Schoenmakers' Chelator [Internet]. [consulta: 17 de julio de 2018]. Disponible en: <http://maxchelator.stanford.edu/CaMgATPEGTA-TS.htm>
4. Cáncer [Internet]. [consulta: 17 de julio de 2018]. Disponible en: <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
5. Cherigo, L., López, D. y Martínez-Luis, S. (2015). Marine natural products as breast cancer

- resistance protein inhibitors. *Mar. Drugs.*, **13**: 2010-2029.
6. **Cruz-López, O., Conejo-García, A., Núñez, M.C., Kimatrai, M., García-Rubiño, M.E., Morales, F., y col.** (2011). Novel substituted quinazolines for potent EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Curr Med Chem.*, **18**: 943-963.
 7. **El-Helby, A-G.A., Ayyad, R.R.A., Sakr, H., El-Adl, K., Ali, M.M. y Khedr, F.** (2018). Design, synthesis, in vitro anti-cancer activity, ADMET profile and molecular docking of novel triazolo[3,4-a]phthalazine derivatives targeting VEGFR-2 enzyme. *Anticancer Agents Med. Chem.*, **18**(8): 1184-1196.
 8. **Faouzi, M., Hague, F., Geerts, D., Ay, A.-S., Potier-Cartereau, M., Ahidouch, A., y col.** (2016). Functional cooperation between KCa3.1 and TRPC1 channels in human breast cancer: Role in cell proliferation and patient prognosis. *Oncotarget.*, **7**: 36419-36435.
 9. **Kale, V.P., Amin, S.G. y Pandey, M.K.** (2015). Targeting ion channels for cancer therapy by repurposing the approved drugs. *Biochim. Biophys. Acta*, **1848**: 2747-2755.
 10. **Kim, J.S., Rhee, H.-K., Park, H.J., Lee, S.K., Lee, C.-O. y Park Choo, H.-Y.** (2008). Synthesis of 1-/2-substituted-[1,2,3]triazolo[4,5-g]phthalazine-4,9-diones and evaluation of their cytotoxicity and topoisomerase II inhibition. *Bioorg. Med. Chem.*, **16**: 4545-4550.
 11. **Lampert, A., Müller, M.M., Berchtold, S., Lang, K.S., Palmada, M., Dobrovinskaya, O., y col.** (2003). Effect of dexamethasone on voltage-gated K⁺ channels in Jurkat T-lymphocytes. *Pflugers Arch.*, **447**: 168-174.
 12. **Lastraioli, E., Iorio, J. y Arcangeli, A.** (2015). Ion channel expression as promising cancer biomarker. *Biochim. Biophys. Acta*, **1848**: 2685-2702.
 13. **Li, X., Dai, T., Zeng, X., Yang, Y., Pan, X. y Wang, Q.** (2005). The relation between potassium channel properties and proliferation of human lung adenocarcinoma cells. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi Chin. J. Lung Cancer*, **8**: 261-265.
 14. **Mantle, D., Lennard, T.W. y Pickering, A.T.** (2000). Therapeutic applications of medicinal plants in the treatment of breast cancer: a review of their pharmacology, efficacy and tolerability. *Adverse Drug React. Toxicol. Rev.*, **19**(3): 223-240.
 15. **O'Grady, S.M. y Lee, S.Y.** (2005). Molecular diversity and function of voltage-gated (Kv) potassium channels in epithelial cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **37**: 1578-1594.
 16. **Ouadid-Ahidouch, H. y Ahidouch, A.** (2008). K⁺ channel expression in human breast cancer cells: involvement in cell cycle regulation and carcinogenesis. *J. Membr. Biol.*, **221**: 1-6.
 17. **Ouadid-Ahidouch H, Ahidouch A, Pardo LA.** (2016) Kv10.1 K(+) channel: from physiology to cancer. *Pflugers Arch.* **468**: 751-62.
 18. **Rodríguez-Rasgado, J.A., Acuña-Macías, I. y Camacho, J.** (2012). Eag1 channels as potential cancer biomarkers. *Sensors*, **12**: 5986-5995.
 19. **Servicios digitales** [Internet]. [consulta: 17 de julio de 2018]. Disponible en: <https://www.sociedadanticancerosa.org/educacion-y-prevencion/digitales/>
 20. **Teisseyre, A., Gąsiorowska, J. y Michalak, K.** (2015). Voltage-Gated Potassium Channels Kv1.3-Potentially New Molecular Target in Cancer Diagnostics and Therapy. *Adv. Clin. Exp. Med. Off Organ Wroclaw Med. Univ.*, **24**: 517-524.
 21. **Uckun, F.M., Mao, C., Jan, S.T., Huang, H., Vassilev, A.O., Sudbeck, E.A., y col.** (2000). SPIKET and COBRA compounds as novel tubulin modulators with potent anticancer activity. *Curr. Opin. Investig. Drugs Lond. Engl.*, **1**: 252-256.
 22. **Uckun, F.M., Sudbeck, E.A., Mao, C., Ghosh, S., Liu, X.P., Vassilev, A.O., y col.** (2001). Structure-based design of novel anticancer agents. *Curr. Cancer Drug Targets.*, **1**: 59-71.
 23. **Wallace, J.L., Gow, I.F. y Warnock, M.** (2011). The life and death of breast cancer cells: proposing a role for the effects of phytoestrogens on potassium channels. *J. Membr. Biol.*, **242**: 53-67.
 24. **Xue, D.-Q., Zhang, X.-Y., Wang, C.-J., Ma, L.-Y., Zhu, N., He, P., y col.** (2014). Synthesis and anticancer activities of novel 1,2,4-triazolo[3,4-a]phthalazine derivatives. *Eur. J. Med. Chem.*, **85**: 235-244.
 25. **Yang, H. y Dou, Q.P.** (2010). Targeting apoptosis pathway with natural terpenoids: implications for treatment of breast and prostate cancer. *Curr. Drug Targets*, **11**: 733-744.
 26. **Yang, L.M., Tin, U.C., Wu, K. y Brown, P.** (1999). Role of retinoid receptors in the prevention and treatment of breast cancer. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, **4**(4): 377-388.
 27. **Zhang, Y., Feng, Y., Chen, L. y Zhu, J.** (2015). Effects of Intermediate-Conductance Ca(2+)-Activated K(+) Channels on Human Endometrial Carcinoma Cells. *Cell Biochem. Biophys.*, **72**: 515-525.

Marcadores moleculares en *Kinetoplastida*: Variabilidad genética de *Triatoma maculata* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae), vector del *Trypanosoma cruzi*, en áreas endémicas de Venezuela

ROBERTO GARCÍA-ALZATE^{1,2}, DAISY LOZANO-ARIAS^{1,2},
RAFAEL MATÍAS REYES-LUGO³, ANTONIO MOROCOIMA⁴,
LEIDI HERRERA² Y ALEXIS MENDOZA-LEÓN¹

¹Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de Parásitos. IBE; ²Instituto de Zoología y Ecología Tropical (IZET), Facultad de Ciencias; ³Instituto de Medicina Tropical, Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela (UCV). ⁴Instituto de Medicina Tropical (IMT-UDO), Universidad de Oriente. Puerto la Cruz, Estado Anzoátegui. Venezuela. Correo: amendoza50@gmail.com

La identificación de marcadores moleculares genotípicos específicos de un parásito, constituye una herramienta apropiada para utilizarla en su identificación, diagnóstico y epidemiología de la patología que pueda producir. *Triatoma maculata*, vector del *Trypanosoma cruzi* causante de la enfermedad de Chagas, ha sido considerada una especie silvestre propia de palmas, árboles secos, cercas y nidos de aves. La variabilidad genética y la variación intraespecífica de esta especie pueden ser fundamentales en el control y vigilancia vectorial. Adultos de *T. maculata*, un total de 176 individuos, fueron capturados en el período 2012–2013 en áreas domésticas, peri-domésticas y silvestres de diferentes regiones endémicas de Venezuela. Estos ejemplares fueron sometidos a evaluación comparativa de la variabilidad de marcadores genotípicos como el gen 16S rRNA y la región de los genes de β -tubulina. Los resultados revelan que insectos capturados en el hábitat doméstico mostraron un marcado polimorfismo para los marcadores estudiados, en comparación con aquellos insectos capturados en el peri-domicilio o en su hábitat silvestre, corroborando estudios previos utilizando la variabilidad del gen mitocondrial *Cyt b*. En términos epidemiológicos, los resultados confirman la domiciliación de *T. maculata*, representando un alto riesgo de transmisión de la enfermedad de Chagas.

Introducción

Los triatominos (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) son insectos hematófagos estrictos, que actúan como vectores de tripanosomatideos tales como *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la Tripanosomosis Americana o Enfermedad de Chagas (ECh), una de las parasitosis de gran importancia médica en el Neotrópico. En Venezuela, la ECh constituye un problema de salud pública (1,9). Tanto en Venezuela como en otros países de Sur América, la transmisión vectorial de *T. cruzi*, ha sido asociada tradicionalmente a los ambientes domésticos (D) y peridomésticos (PD) de áreas rurales, con condiciones socioeconómicas precarias y con elevada presencia de vectores. Sin embargo, han aumentado las evidencias de colonización del domicilio urbano por triatominos, tales como *Triatoma maculata* y *Panstrongylus geniculatus*, que hasta ahora habían sido asociados mayormente a hábitats silvestres (S) (2,4,5).

La domiciliación de los triatominos pudiese ser un evento adaptativo, que algunas veces puede llevar a la simplificación de características fenotípicas y genotípicas. En un estudio previo, con el objetivo de determinar el desplazamiento de *T. maculata* al hábitat doméstico, evaluamos comparativamente la

variabilidad fenotípica y genotípica como un potencial indicador del desplazamiento de subpoblaciones del vector capturadas en distintos estados venezolanos. La evaluación fenotípica se realizó a través del análisis de morfometría geométrica que incluyó la determinación del tamaño isométrico y conformación del ala izquierda de cada insecto. Los resultados mostraron que los insectos del hábitat doméstico (D) presentaron reducciones significativas en el tamaño del ala y variaciones en las características anatómicas asociadas con el vuelo, en relación con hábitats peridoméstico (PD) y silvestres (S). La mayor variabilidad se encontró en Anzoátegui y Monagas. La variabilidad genotípica se determinó mediante la comparación de secuencias *in silico* de marcadores moleculares como *Cyt b* y análisis de PCR-RFLP, que demuestran un marcado polimorfismo para dicho marcador en insectos del hábitat doméstico, en comparación con los otros hábitats. Los resultados sugieren la colonización del hábitat doméstico por parte del vector *T. maculata* que en términos epidemiológicos, junto con la presencia en este hábitat de ninfas del vector, representa un alto riesgo de transmisión de la enfermedad de Chagas.

En este trabajo se evalúa la dispersión del vector *T. maculata* a lo largo de ecótopos S, PD, y D, en varias zonas endémicas de distintos estados de Venezuela, utilizando un enfoque genotípico mediante un estudio comparativo del polimorfismo de marcadores moleculares rRNA 16S y la región de los genes de β -tubulina.

Variabilidad genética en *T. maculata*

El DNA de triatomino de cada área geográfica, fue aislado a partir de sus patas y la integridad y el rendimiento del mismo se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa (no mostrado). La amplificación del gen 16S rRNA, se llevó a cabo de acuerdo a lo indicado por Segura y col. (7), obteniéndose un producto único de amplificación de 397 pb para todos los ejemplares colectados en los seis estados en estudio (Anzoátegui, Sucre, Monagas, Nva. Esparta, Portuguesa y Bolívar), independientemente del ecótopo donde se produjo la captura (Fig. 1).

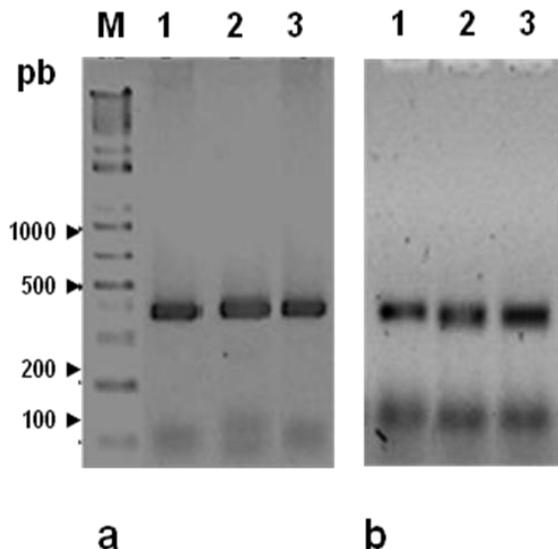


Fig. 1. Amplificación del rRNA16S de *Triatoma maculata* de diferentes estados venezolanos. Productos de amplificación de la secuencia del rRNA16S a partir del DNA genómico de especímenes de *T. maculata* provenientes del estado Anzoátegui (a) y distintos ecotopes del estado (b), utilizado como referencia. a) Línea 1: Anzoátegui, línea 2: Sucre, y línea 3: Monagas. (b): lane 1, D (Doméstico); línea 2, PD (Peridoméstico), línea 3, S (Silvestre). Los productos de amplificación fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% y el DNA fue visualizado a través de tinción con bromuro de etidio (Br Eth). Marcador de peso molecular (M): 100 bp (GIBCO BRL).

El patrón de bandas generado para el gen 16S, en un análisis PCR-RFPL, por las endonucleasas *EcoRV/Hind III* en las muestras de triatomino fue el mismo, independientemente de la región o ecótopo, lo cual sugiere que es una secuencia altamente conservada (Fig. 2).

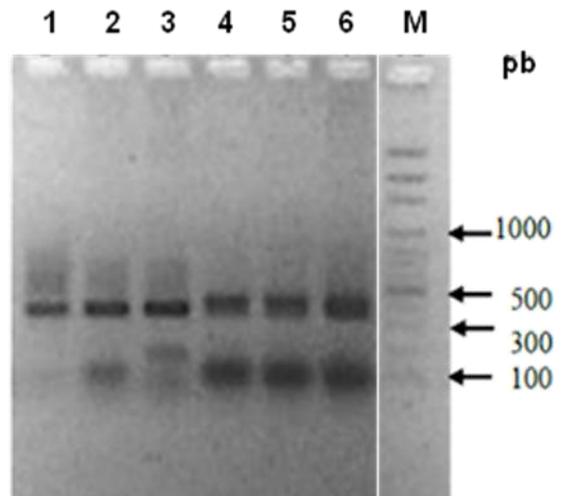


Fig. 2. Variabilidad genética del rRNA16S de *Triatoma maculata* de diferentes estados venezolanos. Los productos de amplificación del gen 16S rRNA generados a partir del DNA genómico de diversos especímenes de *Triatoma maculata*, fueron sometidos a un análisis de RFLP mediante doble digestión con las endonucleasas *EcoRV/HindIII*. Anzoátegui: línea 1, D; línea 2, PD; línea 3, S; Sucre: línea 4, D; línea 5, PD; línea 6, S. Los productos generados fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% y el DNA fue visualizado a través de tinción con bromuro de etidio (Br Eth). Marcador de peso molecular (M): 100 bp (GIBCO BRL).

Un segundo marcador genotípico evaluado fue el gen de la β -tubulina de *T. maculata*. Previamente, para la obtención del marcador se construyó un sistema de clonación, secuenciación y evaluación de la secuencia recombinante mediante técnicas convencionales (8). Utilizando un análisis bioinformático a partir de secuencias depositadas en el banco de datos y las experiencias previas con este gen en nuestro laboratorio (referencia del GenBank N° AE013599.5; M38265.1; GBBIO1001458.1) se determinó la secuencia parcial del gen y se diseñaron los iniciadores que amplificaron el gen de la β -tubulina para triatomino en estudio. El ensayo de PCR para esta secuencia generó un fragmento de ~980 pb a

partir del DNA de triatominos colectados de cada estado y ecótopo (Fig. 3).

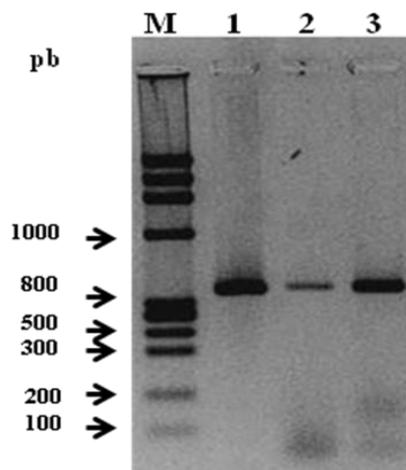


Fig. 3. Amplificación del gen de la β -tubulina de *Triatoma maculata* de diferentes ecótopos de distintos estados de Venezuela. La amplificación del gen de la β -tubulina se llevó a cabo a partir del DNA genómico obtenido de distintos ejemplares de *T. maculata* capturados en diferentes regiones y ecótopos de Venezuela. M, Marcador DNA 100 pb (Gibco BRL). Se muestran los productos de amplificación de diferentes ecótopos del estado Anzoátegui, D: Doméstico (línea 1), PD: Peridoméstico (línea 2), y S: Silvestre (línea 3), en representación de los estados en estudio; los estados Sucre y Monagas mostraron el mismo patrón de bandas. Los productos de amplificación fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% y el DNA fue visualizado a través de tinción con bromuro de etidio (Br Eth).

El patrón de bandas en el análisis PCR-RFPLs, generado por la acción de las enzimas *BamHI/KpnI*, sugirió variabilidad de la especie *T. maculata* en relación al ecótopo y/o del estado (4,5). Los estados Monagas y Anzoátegui mostraron mayores diferencias en cuanto al patrón de bandeo por ecótopos (Fig. 4). El análisis de estos patrones con el programa Gel Compar II (Versión 5.1.), utilizando criterios de Máxima Parsimonia, Máxima y Mínima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana, reveló una topología característica para ejemplares de cada estado. Sin embargo, las muestras de Anzoátegui y Monagas revelaron agrupamientos similares en los perfiles genéticos, donde ejemplares de los ecótopos S y PD tienen similitud de agrupamiento que difiere de la agrupación de los ejemplares D. Cabe destacar

que para identificar si existen variaciones genéticas marcadas entre los estados, será necesario realizar pruebas donde se comparen ejemplares de distintos estados para un mismo ecótopo, esto con el fin de explicar de forma cuantitativa la posible existencia de variabilidad intraespecífica en cada estado.

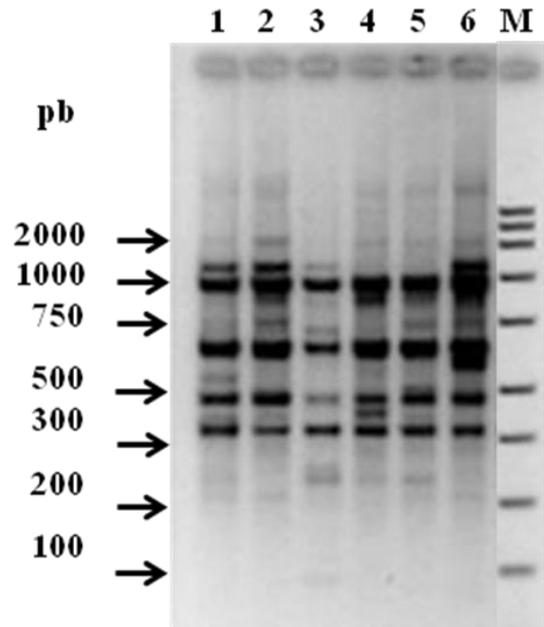


Fig. 4. Variabilidad del gen de la β -tubulina de *Triatoma maculata* de diferentes ecótopos y regiones de Venezuela. Productos amplificados del gen de la β -tubulina fueron digeridos con las enzimas *BamHI/KpnI*. Líneas 1-3: Anzoátegui (1, D; 2, PD; 3, S); Líneas 4-6: Sucre (4, D; 5, PD; 6, S). (M) Marcador DNA 100 pb (Gibco BRL). Los productos de amplificación fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% y el DNA fue visualizado a través de tinción con bromuro de etidio (Br Eth).

Estos resultados confirman los estudios previos sobre la aplicabilidad de marcadores moleculares como *Cyt-b*, rRNA 16S y β -tubulina entre otros, para evaluar la genética de poblaciones en triatominos y obtener información del flujo de genes sobre pequeñas distancias, es decir, las poblaciones por ecótopos. Por otra parte, el estudio de variabilidad genética de *T. maculata* mediante la técnica molecular como el análisis de PCR-RFLP es una prueba robusta que permite la diferenciación entre subpoblaciones y nichos ecológicos, tal como se demuestra en este estudio. La variabilidad en los marcadores moleculares describe parcialmente la asociación con los ciclos de transmisión. Ello sugiere la importancia

en la vigilancia epidemiológica para los vectores secundarios que buscan ocupar el espacio dejado por el vector domiciliario, con el fin de asegurar que estas especies no se conviertan en un severo problema de salud pública. Para ello, es necesario incrementar las medidas de control a través de la capacitación activa de la comunidad, así como disminuir la colonización por triatominos en áreas suburbanas, de manera que este control sea sostenible en el tiempo.

En los estados Anzoátegui y Monagas, la continuidad de los ecótopos silvestres, domésticos, peridomésticos y las características propias de las viviendas, podrían favorecer el desplazamiento de los vectores y su establecimiento exitoso como eslabón de los focos domiciliarios. Un ejemplo particular de la región nororiental lo constituyen los trabajos de Morocoima y col. (6), en los cuales se reportaron palmeras infestadas con triatominos con elevado índice de infección por *T. cruzi*, dentro de un área de 100 metros alrededor de la vivienda, representando un factor de riesgo para la colonización domiciliar, aunado al elevado índice de infección natural en la población humana. Por otro lado, cambios ayudados por las acciones antropogénicas (deforestación, caza) impactan el hábitat natural y por ende la fuente de alimento de los triatominos, por lo cual los insectos son presionados a migrar y buscar microambientes similares a su hábitat natural, hecho que podría conducir a la domiciliación de los vectores (3,5,6).

Conclusiones

Los estudios de variabilidad genotípica en *T. maculata* mostrados en este estudio confirman una adaptación al domicilio por parte *T. maculata*.

Se corroboran, mediante técnicas genotípica utilizando distintos marcadores genotípicos, procesos de adaptación de *T. maculata* a cada ecótopo (D, PD y S).

Agradecimientos

Financiamiento: CDCH: CDCH PG 038171-2011/1 (L. Herrera) y PG-03-8121-2011/1 (A. Mendoza-León). Proyecto estratégico FONACIT N° 2011000470; Proyecto Misión Ciencia N° 2008000911-6. A mis estudiantes, colegas y colaboradores por sus aportes en el desarrollo de esta línea de investigación.

Referencias

1. Añez, N., Crisante, G. y Rojas, A. (2004). Update on Chagas disease in Venezuela. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **99**: 781–787.

2. Bechara, C.C.N., Londoño, J.C., Segovia, M., Sánchez, M.A.L., Martínez, P.C.E., Rodríguez, R.M.M. y Carrasco, H.J. (2018). Genetic variability of *Panstrongylus geniculatus* (Reduviidae: Triatominae) in the Metropolitan District of Caracas, Venezuela. *Infect. Genet. Evol.* Meegid. doi: 10.1016/j.meegid.2018.09.011.
3. Dujardin, J.P., Beard, C.B. y Ryckman, R. (2007). The relevance of wing geometry in entomological surveillance of Triatominae, vectors of Chagas disease. *Infect Genet Evol.*, **7**: 161–167.
4. García-Alzate, R.J. (2015). **Variabilidad genética y fenotípica de *Triatoma maculata* (Hemiptera, Reduviidae) vector de la enfermedad de Chagas en Venezuela.** Tesis Doctoral. Postgrado en Biología Celular, Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela.
5. García-Alzate, R., Lozano-Arias, D., Reyes-Lugo, R.M., Morocoima, A., Herrera, L. y Mendoza-León, A. (2014). *Triatomamaculata*, the vector of *Trypanosoma cruzi*, in Venezuela. Phenotypic and genotypic variability as potential indicator of vector displacement into the domestic habitat. *Front. Public Health*, **2**: 170.
6. Morocoima, A., Chique, J., Zavala-Jaspe, R., Díaz-Bello, Z., Ferrer, E., Urdaneta- Morales, S. et al. (2010). Commercial coconut palms an ecotope of Chagas disease vectors in north-eastern Venezuela. *J. Vector Borne Dis.*, **47**: 76–84.
7. Segura, E., Torres, A., Fusco, O. y García, B. (2009). Mitochondrial 16S DNA variation in populations of *Triatoma infestans* from Argentina. *Med. Vet. Entomol.*, **23**: 34-40.
8. Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989). **Molecular cloning: a laboratory manual.** 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1.1.
9. **World Health Organization.** (2014). Chagas Disease (American Trypanosomiasis). Fact Sheet N° 340.

Perspectivas para la formación de postgrado en Biología Aplicada al Diagnóstico de enfermedades causadas por microorganismos

PALMIRA GUEVARA¹, JAHELI FUENMAYOR² Y LUZ THOMAS²

¹Laboratorio de Genética Molecular. Centro de Biología Celular

Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela

Calle Suapure, Colinas de Bello Monte. ²Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas.

Caracas – República Bolivariana de Venezuela. Correo: palmiragt@yahoo.com.mx

Usar el genoma de microorganismos como biomarcador para generar pruebas diagnósticas innovadoras en formatos amenos para su incorporación en la rutina del diagnóstico clínico ha sido una línea de investigación del Laboratorio de Genética Molecular, abarcando enfermedades endémicas en nuestro país y la región como leishmaniasis, enfermedad de Chagas y malaria, incluyendo el diagnóstico diferencial de meningitis bacterianas. Esta investigación ha estado acompañada por un componente de formación que ha evolucionado desde pasantías, cursos cortos y materias de ampliación, hasta la consolidación de una propuesta de formación a nivel de especialización, en conjunto con el Instituto Nacional de Higiene “Rafael Rangel” y el Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas. La especialización en Biología Aplicada al Diagnóstico está dirigida a actualizar al profesional en los fundamentos teóricos y la aplicación de técnicas basadas en biomarcadores para el diagnóstico de enfermedades endémicas y emergentes en el país y la región, atendiendo a su formación integral en el manejo de las normativas de bioseguridad vigentes, enfocadas en la protección del operario y del ambiente, con un alto sentido ético y sensibilidad social, construyendo a nivel nacional, la capacidad diagnóstica laboratorial óptima al servicio de la vigilancia en salud con soberanía, independencia y equidad.

Introducción

La generación de nuevos conocimientos y metodologías, así como la incorporación de técnicas innovadoras orientadas a aumentar la sensibilidad y especificidad de pruebas diagnósticas, utilizando como biomarcador al genoma de los microorganismos y atendiendo a formatos amenos para su incorporación en la rutina del diagnóstico clínico, ha sido un tema de sostenida ocupación en la investigación del Laboratorio de Genética Molecular del Instituto de Biología Experimental desde el inicio de sus actividades en los años 80.

Las experiencias más tempranas estuvieron dirigidas a la generación de sondas de ADN y a la sustitución de isótopos radiactivos en el marcaje, acoplados a la incorporación de la hibridación *in situ* para el análisis de frotis de lesiones para el diagnóstico de leishmaniasis (2,3) y de cortes de tejidos para la identificación temprana de la infección por Virus de Papiloma Humano (VPH), en cortes de tejidos (9). Estas experiencias constituyeron las primeras incursiones para trasladar el diagnóstico molecular del laboratorio de investigación al laboratorio clínico en los centros de atención hospitalaria del país (Fig. 1).

Conociendo la posibilidad de amplificar de forma específica regiones del genoma mediante la síntesis de ADN generado en la reacción de polimerización

en cadena o PCR (por sus siglas en inglés, *Polymerase Chain Reaction*), desarrollamos ensayos para la identificación de especies de *Leishmania*, *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma rangeli* utilizados en el diagnóstico diferencial de infecciones en lesiones cutáneas por especies de *Leishmania* y en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas (4). Realizamos estudios comparativos entre la evaluación por microscopía de muestras de sangre y por ensayos de PCR de punto final para el diagnóstico de malaria por *Plasmodium falciparum*, así como para la detección de infecciones mixtas con miras a optimizar el diagnóstico en zonas endémicas del estado Bolívar (12).

En la búsqueda de métodos más sensible, sencillos y prácticos para el diagnóstico molecular en espacios asistenciales y de diagnóstico en campo, desarrollamos también dos pruebas basadas en la amplificación isotérmica autogenerada LAMP (por sus siglas en inglés, *Isothermic Loop Amplification*): una dirigida a la identificación de *Leishmania* spp. y el diagnóstico de leishmaniasis cutánea (8) y la otra para la detección de *Trypanosoma vivax* (1). Igualmente, incorporamos dos ensayos para la identificación de *T. cruzi* y *T. rangeli* (11). Posteriormente, ampliamos las pruebas moleculares para incluir el diagnóstico diferencial de meningitis en niños y niñas causada por *Haemophilus influenzae* tipo *b* y otras bacterias, mediante el

diseño de un ensayo de detección de polimorfismos por longitud de fragmentos de restricción PCR-RFLP (por sus siglas del inglés, *Restriction Fragment Length Polymorphisms*) sobre el ADN ribosomal (ADNr), proponiendo además un algoritmo que abarca desde la toma de la muestra de líquido cefalorraquídeo, su preservación y procesamiento, hasta la definición de una serie de pruebas para el diagnóstico molecular de meningitis bacterianas (4).

Evolución en la sistematización de la formación:

i) Cursos cortos, pasantías y desarrollo de manuales
Esta iniciativa de desarrollo e innovación en el diagnóstico ha estado acompañada por una sostenida labor de formación en el país y en la región (Tabla 1), orientando la investigación básica a la aplicación pertinente de los conocimientos. Durante décadas hemos dictado cursos cortos, nacionales e internacionales, de actualización en tecnologías de punta y ofrecido pasantías a profesionales de diferentes disciplinas (odontología, bioanálisis, medicina, antropología, biología, veterinaria, inclusive agronomía y botánica), vinculadas al diagnóstico de enfermedades causadas por microorganismos.

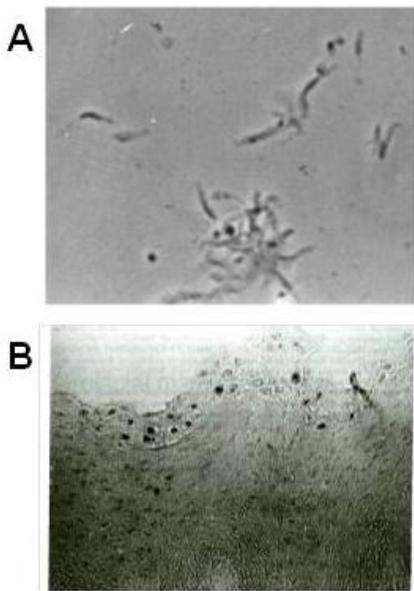


Fig. 1. Hibridación *in situ* con sondas no radiactivas. A) Promastigotes de cultivo de *Leishmania mexicana* MHOM/BZ/82/Bel21, sonda pLgr1 (2). B) Hibridación en secciones de biopsias de mucosa bucal embebidas en parafina con sondas mixtas (VHP tipos 6, 11, 16 y 18) para la detección de VPH en células epitelial (9). Las sondas fueron marcadas con digoxigenina, detectadas con anticuerpos anti-digoxigenina conjugados a fosfatasa alcalina y revelados por colorimetría. 1000X.

Tabla 1. Cursos ofrecidos por el Laboratorio de Genética Molecular.

Curso teórico/práctico	año	técnicas	lugar	Coordinación/financiamento
Taller de identificación de especies de <i>Leishmania</i> en frotis de lesiones de leishmaniasis mucocutáneas	198 6	Marcaje no radiactivo. Hibridación <i>in situ</i> .	LGM/IBE Caracas/Venezuela	Ramírez J. L.
Curso internacional de adiestramiento "Aplicación de técnicas de DNA recombinante en el diagnóstico de enfermedades parasitarias"	200 2	Expresión de antígenos recombinantes. PCR punto final. Electroforesis en gels horizontales de agarosa y gels verticales de poliacrilamida. Western-blot.	LGM/IBE/Facultad de Ciencias/UCV Caracas/Venezuela	Guevara, P. y Da Silveira, J.F. UNU Biolac
Curso internacional "Acercando el diagnóstico molecular al escenario operativo de las enfermedades emergentes, re-emergentes y endémicas causadas por parásitos y bacterias: implementación de pruebas diagnósticas isotérmicas LAMP"	201 1	Ensayos de amplificación isotérmica mediada por asa LAMP para la identificación <i>T. cruzi</i> , <i>T. rangeli</i> , <i>T. evansi</i> , especies de <i>Leishmania</i> (V) complejo guayanesis, complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>Babesia bovis</i> , <i>B. canis</i> , <i>B. bigemina</i> , <i>B. canis</i> , género <i>Plasmodium</i> , <i>P. falciparum</i> , <i>P. malariae</i> , <i>P. vivax</i> , y <i>P. ovale</i> . Toma de muestra en papel FTA y procesamiento. Preparación de muestras para la reacción LAMP.	LGM/IBE/Facultad de Ciencias/UCV Caracas/Venezuela	Guevara, P. UNU Biolac/CDC/UCV/ Proyecto Misión Ciencias G-2007001442
International Biotechnology Symposium & Training Workshop "DNA Fingerprinting of Plants: Approaches, Applications and Relevance to the Agricultural Sector in the Caribbean and Latin America"	201 6	PCR en punto final. RAPDs	University of West Indies- Kingston, Jamaica	University of West Indies UNU/BioLac
Curso teórico/práctico	año	técnicas	lugar	Coordinación/financiamento
Curso teórico Materia de ampliación Bases del diagnóstico molecular I: Estructura y función de moléculas biológicas.	200 7	Detección de Polimorfismos de un nucleótido (Single Nucleotide Polymorphism: SNP). P.E.R. Polimorfismos de longitud en los fragmentos de restricción. Random Amplified Polymorphic DNA. RAPD PCR punto final. Electroforesis en gels horizontales de agarosa y gels verticales de poliacrilamida. Western-blot.	Postgrado en Facultad de Ciencias/UCV Caracas/Venezuela	Guevara, P. Proyecto LOCTI
Materia de ampliación Bases del diagnóstico molecular II: Principios de inmunología aplicada	200 8	PCR punto final. Electroforesis en gels horizontales de agarosa y gels verticales de poliacrilamida. Western-blot.	Postgrado en Facultad de Ciencias/UCV Caracas/Venezuela	Guevara, P. Proyecto LOCTI

Esta experiencia ha sido acompañada de una sistematización del conocimiento para su uso práctico y de un incremento en el alcance a la población interesada en la aplicación de estas técnicas, a través de la publicación de manuales de protocolos y procedimientos para el diagnóstico en el laboratorio clínico especializado (2,4,5).

ii) Estructuración de estas experiencias en un programa de formación de postgrado

Históricamente en el país, el acento de los programas de postgrado en ciencias y biomedicina se ha dirigido a la formación de investigadores e investigadores en ciencias básicas en los niveles de Maestría y Doctorado. Estos programas no han tenido el alcance suficiente sobre los espacios asistenciales para impactar en la calidad de vida de la población. Hasta el presente, no contamos con una oferta formal, particularmente diseñada a nivel de especialización, que responda a la demanda de formación de profesionales capacitados en la transferencia y aplicación oportuna de las tecnologías basadas en biomarcadores para el diagnóstico de enfermedades causadas por microorganismos y la identificación del agente etiológico.

En este sentido, en el año 2004, en el contexto de la Iniciativa Científica Milenio y el proyecto de red de innovación tecnológica "Diagnóstico e

Identificación Molecular de Microorganismos” (10), identificamos la necesidad de crear un espacio de innovación que facilitara y promoviera el trabajo colaborativo con un componente de formación. Propusimos la creación de una Especialización Profesional en Identificación y Diagnóstico Molecular como parte del programa de estudios de postgrados integrados (10), el cual cuenta con la participación de diversas instituciones funcionando en red, incluyendo los diferentes sectores y áreas estratégicas de salud, agroalimentaria, biotecnología y petróleo, presentada ante el postgrado en Biología Celular ese mismo año.

En el marco la Ley Orgánica de Ciencia y Tecnología, durante los años 2007-2008 ejecutamos el proyecto de postgrado en el cual ofrecimos dos materias de ampliación (**Tabla 1**) y dotamos el laboratorio de los equipos e insumos necesarios para el dictado de la materia de ampliación “Fundamentos de Genética Molecular”.

En el año 2014, en colaboración con el Instituto Nacional de Higiene “Rafael Rangel”, centro de referencia nacional para el diagnóstico de las enfermedades infectocontagiosas, reactivamos la formulación de la propuesta de especialización (6,7) e iniciamos la formación con la oferta de varias materias del programa como materias de ampliación.

El proyecto de postgrado ha evolucionado a un programa interinstitucional de especialización en Biología Aplicada al Diagnóstico, dirigido a actualizar al profesional en los fundamentos teóricos y la aplicación de las nuevas técnicas de diagnóstico de enfermedades endémicas y emergentes en el país y la región, prestando atención a su formación integral en el manejo de las normativas de bioseguridad vigentes, enfocadas en la protección del operario y del ambiente, cuyo plan de estudios se muestra en la **Fig. 2**. El objetivo es formar profesionales con un alto sentido ético y sensibilidad social, con sólidos fundamentos teóricos y habilidades para la aplicación de tecnologías emergentes basadas en biomarcadores para el diagnóstico de enfermedades causadas por microorganismos, con el propósito de alcanzar una mayor capacidad diagnóstica laboratorial a nivel nacional al servicio de la vigilancia en salud con soberanía, independencia y equidad. En resumen, formar profesionales que fortalezcan las capacidades diagnósticas en los centros de salud en todas las regiones del país.

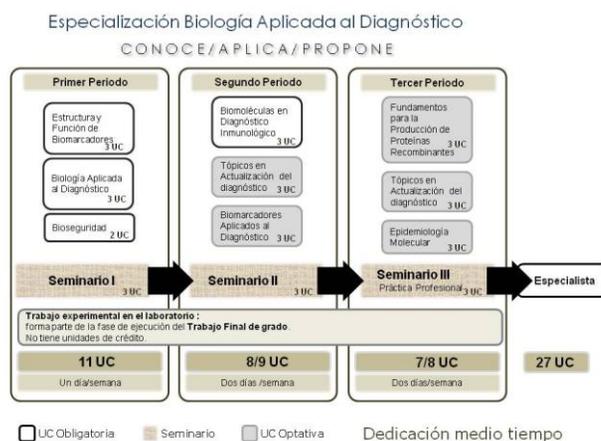


Fig. 2. Plan de estudios del programa de especialización Biología Aplicada al Diagnóstico.

La especialización está planteada a medio tiempo, con una modalidad presencial, tres periodos anuales y una distribución de unidades curriculares obligatorias (11 UC), optativas (7 UC) y tres seminarios (9 UC), haciendo un balance entre los contenidos teóricos y los prácticos. El trabajo de laboratorio, conducente al Trabajo Final de Grado, se inicia desde el primer periodo y los fundamentos de investigación y herramientas metodológicas son abordados en los tres Seminarios de Investigación. Este proyecto de especialización actualmente sigue su curso de aprobación en el Instituto Nacional de Higiene “Rafael Rangel” para ser considerado ante las instancias del Ministerio para el Poder Popular para la Educación Universitaria, Ciencia y Tecnología como un Programa Nacional de Formación Avanzada con alcance en todo el territorio nacional.

Agradecimientos

Para los trabajos aquí reportados el Laboratorio de Genética Molecular/IBE ha recibido financiamiento de los proyectos FONACIT G-2007001442, PEIII No 2012002210 e iniciativa científica Milenio BIRF 4572-VE, coordinados por P. G.

Referencias

- Alejos, M.** (2011). **Desarrollo de la Técnica de Amplificación Isotérmica de ADN mediada por Asas (LAMP) para su aplicación en la detección de *Trypanosoma vivax* en ovinos infectados experimentalmente.** Trabajo Especial de Grado. Escuela de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela.
- Guevara, P.** (1987). Identification of *Leishmania* using non-radioactive probes. **FOCUS**, 9: 4.

3. **Guevara, P.** (1996). **El espaciador ribosomal como herramienta taxonómica en el género *Leishmania***. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela.
4. **Guevara, P.** (editora). (2009). **Identificación y diagnóstico molecular de microorganismos, manual de laboratorio**. Proyecto Misión Ciencia G-2007001442. IBE-UCV. 2a. edición.
5. **Guevara, P.** (2011). **Manual de Laboratorio Implementación de pruebas diagnósticas isotérmicas LAMP en parásitos y bacterias patógenos de animales y humanos**. Proyecto Misión Ciencia G-2007001442. UNUBIOLAC. IBE/UCV.
6. **Guevara-Trejo, P.** (2015). **Nuevas oportunidades de formación en el postgrado en Biología Celular: La especialización en identificación y diagnóstico molecular**. 19ª Conferencia Instituto de Biología Experimental del Ciclo 2014-2015. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela.
7. **Guevara, P. y Díaz, L.** (2015). **Manual de laboratorio para la identificación de la especie *Trypanosoma cruzi* en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas y la tipificación molecular de linajes**. Proyecto PEIII N° 2012002210.
8. **Lacruz, A.** (2011). **Desarrollo de un ensayo de amplificación LAMP para la identificación *Leishmania* spp. y el diagnóstico de Leishmaniasis**. Tesis de Licenciatura. Universidad del Zulia.
9. **Premoli de Percoco, G., Galindo, I. y Ramírez, J.L.** (1992). Rapid and sensitive detection of human papilloma virus DNA in oral mucosal lesion by in situ Cyto-hybridization with digoxigenin labelled probes. 9th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry. Agosto 30-Septiembre 5, Maastricht, Holanda.
10. **Proyecto iniciativa científica Milenio, red de innovación tecnológica “Diagnóstico e identificación molecular de microorganismos”**. (2004). BIRF 4572-VE, Informe final.
11. **Thekisoe, O.M., Rodríguez, C.V., Rivas, F., Coronel-Servian, A.M., Fukumoto, S., Sugimoto, C., Kawasu, S. e Inoue, N.** (2010). Detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* infections from *Rhodnius pallescens* bugs by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **82**: 855-860.
12. **Urdaneta, L., Guevara, P. y Ramirez, J.L.** (1998). Evaluation of DNA recombinant methodologies for the diagnosis of *P. falciparum*

and their comparison with the microscopy assay. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **93**: 639-646.

Invasión de la mucosa bucal por *Trypanosoma cruzi* en la infección experimental oral con el aislado venezolano AM-16

JENIREE SAGASTI¹, CRISTINA SANOJA¹, LORENA MÁRQUEZ² Y GILBERTO PAYARES¹

¹Laboratorio de Inmunología y Quimioterapia. ²Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Tumores. Centro de Biología Celular, Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela
Calle Suapure, Colinas de Bello Monte, Caracas - Venezuela.
Correo: cristina.sanoja.ciens.ucv.ve

Actualmente, contraer la Enfermedad de Chagas por vía oral mediante la ingestión de alimentos contaminados con *Trypanosoma cruzi*, ha adquirido mayor relevancia como problema de salud pública. La aparición simultánea de gran número de casos agudos con una manifiesta morbilidad y mortalidad, la elevan a un plano epidemiológico superior que despierta cada vez más el interés de investigadores y especialistas. Las cepas venezolanas de *T. cruzi* aisladas de vectores silvestres o peri domiciliarios como *Panstrongylus* sp., en áreas urbanas del Valle de Caracas, representan una “bomba de tiempo” que podría explotar por algún descuido involuntario, como el ocurrido en el área metropolitana de Caracas en el año 2007. Los resultados de este trabajo demuestran como tras un muy breve contacto de una suspensión de tripomastigotes de la cepa AM-16 con la cavidad bucal de ratones NMRI, fue posible su diseminación a otros tejidos. Así mismo, el hallazgo histológico de infiltrados inflamatorios celulares (ICI) en lengua y estómago, a las 24, 48 y 72 horas después de la instilación en la cavidad bucal, nos permite sugerir una penetración activa del parásito a través de estos tejidos, sugiriéndolos como puerta de entrada de *T. cruzi*.

Introducción

La Enfermedad de Chagas es una protozoonosis del hombre cuyo agente etiológico es el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*. Su elevada prevalencia y su gran impacto social y económico la ubican, después de la Malaria y la Esquistosomosis, como la tercera parasitosis más importante del mundo. Así mismo, su elevada casuística en los países endémicos, permite considerarla como la segunda más importante en Latinoamérica. En la actualidad, se estima que existen entre 6 y 7 millones de personas infectadas por *T. cruzi* a nivel mundial, la mayoría de ellas en Latinoamérica, provocando 7.000 a 10.000 muertes/año, hecho agravado por los más de 25 millones de habitantes en riesgo de infección, abarcando 13 % de la población de Latinoamérica. (6). Su condición de enfermedad endémica en países tropicales en vías de desarrollo, que afecta los estratos menos privilegiados de la población, le ha conferido por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (6) la condición de enfermedad tropical desatendida.

Hasta hace algunos años la transmisión contaminativa por ingestión accidental del parásito (vía oral), era considerada como una vía inusual de contraer la Enfermedad de Chagas, más bien propia del mantenimiento del ciclo silvestre en la naturaleza. Entre los años 2007 y 2018, en Venezuela se han reportado aproximadamente 343 casos de transmisión oral del Mal de Chagas, la mayor cantidad (287 personas) en la región Capital y sus alrededores, con

más de 5% de fallecidos (1,2,4,7). Las características de virulencia y patogenicidad mostrada por las cepas de *T. cruzi* responsable de estos brotes “epidémicos” y la emergencia causada en salud pública por los numerosos casos de aparición simultánea, han llamado la atención de muchos investigadores. El ciclo peridoméstico y silvestre de este flagelado en áreas del Valle de Caracas tiene como protagonistas, el parásito (*Trypanosoma cruzi*), el insecto vector más común en la zona, *Panstrongylus geniculatus* y el principal reservorio, el rabipelado (*Didelphis marsupialis*). A nuestro laboratorio en Colinas de Bello Monte acuden personas solicitando los servicios para la identificación de chipos y la verificación de su estado de infección con *T. cruzi*. Este servicio (*ad honorem*), nos ha permitido obtener varios aislados del parásito del área de Caracas que están siendo estudiados por investigadores y por estudiantes de la Licenciatura en Biología. Principalmente, la biología de la infección oral de la enfermedad en el modelo murino (ratones), ha sido el objeto de nuestros estudios. Para ello, hemos utilizado un enfoque parasitológico, inmunológico, histopatológico y molecular.

Resultados previos en nuestro laboratorio (3,8), han demostrado mediante herramientas de taxonomía molecular (PCR ADNk) que los aislados del Valle de Caracas, (MACH-1 y YAGUA) pertenecen a la especie *Trypanosoma cruzi*. Igualmente, hemos demostrado que, en infecciones orales del ratón,

además del tropismo cardíaco mostrado por estos aislados, el parásito utiliza la cavidad peritoneal como un reservorio donde se multiplica y alcanza una concentración (tripomastigotes/ml) mayor que la obtenida en sangre (8).

En este trabajo, hemos comparado la evolución parasitológica de la infección en ratones inoculados por tres vías diferentes: la cavidad oral, la inoculación intragástrica y la intraperitoneal. Conjuntamente, se llevó a cabo el estudio histopatológico de la mucosa oral y gástrica, con miras a establecer la puerta de entrada de los tripomastigotes utilizados. Como control positivo se emplearon ratones inoculados intraperitonealmente con el mismo inóculo y como control negativo ratones sanos sometidos a la misma manipulación y sin suministrar parásitos.

Metodología

Parásito: El parásito *Trypanosoma cruzi* (aislado AM-16) utilizado en esta investigación fue obtenido de un chipo adulto *Panstrongylus* sp. capturado en una vivienda ubicada en el Sector Santa Clara, El Cafetal, Municipio Baruta, Distrito Capital, Venezuela. Previamente, este aislado (AM-16) fue identificado como *T. cruzi* mediante PCR ADNk y su ciclo experimental fue estabilizado mediante pases sucesivos en ratones y chipos *Rhodnius prolixus* (8).

Infecciones experimentales: Para la vía oral-cavidad bucal (MB), 200.000 tripomastigotes en 0,05 ml de PBS fueron instilados durante 1 minuto en la cavidad bucal de 8 ratones hembras NMRI, mientras que para la vía gástrica (MG) e intraperitoneal (IP) se empleó el mismo número de flagelados en un volumen 4 veces mayor (0,2 ml) y en igual número de ratones. En el caso de la infección por vía gástrica, se introdujo una cánula acoplada a una jeringa por la boca y se depositó el inóculo directamente en el estómago de los ratones. El progreso de la infección fue seguido en todos los animales mediante evaluación en fresco de la parasitemia y por hematocrito. La concentración de flagelados en la cavidad peritoneal se determinó por conteo en la cámara de Neubauer, dos veces por semana (3). Igualmente, se registraron las condiciones generales de salud, variaciones de peso corporal y la sobrevivencia de los animales. La evaluación histopatológica de mejillas, lengua y estómago se llevó a cabo en otro grupo de 8 ratones infectados con 200.000 tripomastigotes en 0,05 ml de PBS en la cavidad bucal y estos fueron sacrificados a razón de dos ratones/tiempo de evaluación a las 4, 24, 48 y 72 horas post-infección (p.i). Un ratón sano fue usado como control. Muestras de exudado peritoneal fueron obtenidas

durante la fase aguda de la infección y teñidas con el colorante Giemsa®.

Resultados

Durante la segunda semana de observación, los ratones de los grupos infectados por las diferentes vías (MB, MG e IP) mostraron un evidente deterioro en su condición física: pelo erizado, dificultad de movimientos sobre todo del tren posterior, respiración entrecortada, ojos “achinados” y pérdida significativa de peso corporal.

La sobrevivencia en todos los grupos al final del período de observación (46 días d.p.i.) fue MB 75% > MG 50% > IP 42,85%. Estos resultados sugieren que la infección experimental de los ratones con el aislado local AM-16 de *Trypanosoma cruzi*, por vía oral en la cavidad bucal, gástrica e intraperitoneal, fue exitosa. Sin embargo, la presencia de tripomastigotes en sangre (parasitemia) a causa de la invasión y colonización del parásito introducido por las tres vías, no resultó igual. Paralelamente, la presencia de tripomastigotes en la cavidad peritoneal mostró una tendencia similar con 12,5%, 37,5% y 100% de positividad en MB, MG e IP, respectivamente. La evolución de la parasitemia en el tiempo mostró que los valores más elevados se presentaron en los ratones infectados en la cavidad bucal y directamente en el estómago antes de las dos semanas p.i., mientras que en la cavidad peritoneal, la mayor concentración se detectó en el grupo infectado por vía gástrica 35 d.p.i. La concentración de parásitos fue mucho más elevada en la cavidad peritoneal que en la sangre, corroborando los resultados reportados anteriormente en nuestro laboratorio (3,8). El máximo número de parásitos en este sitio siguió el orden creciente IP>MG>MB, lo cual es explicable por la inoculación directa de todos los parásitos en la cavidad peritoneal y en el estómago. Esta mayor concentración de tripomastigotes en la cavidad abdominal y su permanencia durante la fase aguda, representa una fuente alternativa para la obtención de ADN de *T. cruzi*, compensando la baja parasitemia que se detecta en la mayoría de los aislados venezolanos y la dificultad que constituye la obtención de suficiente ADN a partir de tripomastigotes sanguíneos para la realización de ensayos moleculares (PCR).

Evaluación histopatológica

Focos inflamatorios en el tejido muscular de la lengua y del estómago en los ratones infectados en la cavidad bucal (MB) y en el estómago (MG), fueron detectados histológicamente. En efecto, las muestras tomadas 24 y 72 horas después de la infección en la cavidad bucal (**Figs. 1 y 2**) muestran un foco inflamatorio en la región muscular esquelética de la lengua con un abundante infiltrado celular de tipo

inflamatorio (ver flechas). Una discontinuidad y disrupción de las fibras musculares se apreciaron claramente 72 horas p.i. (* en **Fig. 2B**). El estudio histológico del estómago, reveló a las 24 horas post infección la presencia de un notable infiltrado inflamatorio en la región fúndica y pilórica (**Figs. 3 y 4**).

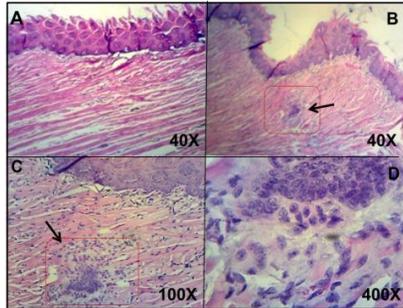


Fig. 1. Estudio histológico de la penetración y colonización de *T. cruzi* luego de la instilación de tripomastigotes en la cavidad bucal. Infiltrado celular inflamatorio observado a las 24 horas en lengua A) Ratón sano (control), B-D) Ratón infectado. Tinción H & E

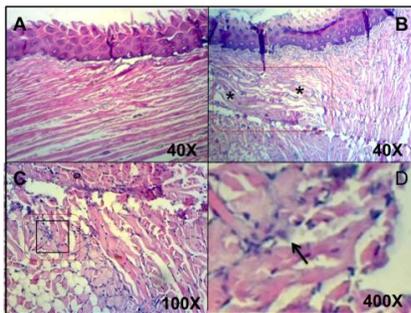


Fig. 2. Infiltrado celular inflamatorio a las 72 horas en lengua discontinuidad y disrupción de las fibras musculares. A) ratón sano (control), B-D) Ratón infectado. Las flechas señalan el foco inflamatorio observado en el tejido muscular. Tinción H & E.

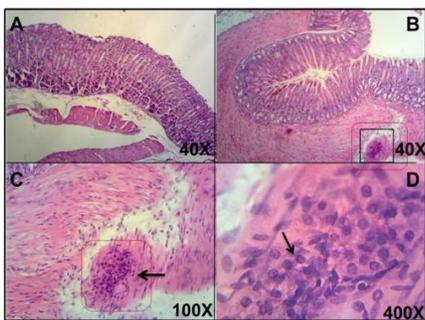


Fig. 3. Foco inflamatorio a las 24 horas en región pilórica del estómago. A) Ratón sano (control), B-D) Ratón infectado. El recuadro y las flechas señalan el foco inflamatorio localizado en el tejido muscular. Tinción H & E.

Aun cuando no se detectaron parásitos libres ni nidos de amastigotes en los cortes de los tejidos procesados (lengua, mejillas y estómago), muestras del exudado peritoneal de los ratones infectados revelaron amastigotes y flagelados en el citoplasma de macrófagos (no mostrado).

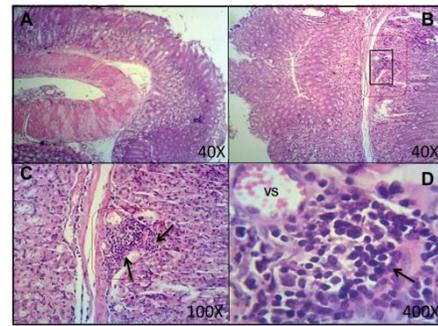


Fig. 4. Infiltrado inflamatorio a las 48 horas en región fúndica del estómago. A) Ratón sano (control), B-D) Ratón con 48 horas de infección. VS: vaso sanguíneo. Tinción H&E.

En las mejillas no se detectaron focos inflamatorios ni nidos de amastigotes en los tiempos evaluados.

Discusión y conclusiones

Los últimos brotes de Enfermedad de Chagas por transmisión oral ocurridos en nuestro país han evidenciado un claro aumento en la gravedad de las manifestaciones clínicas durante la fase aguda de los pacientes, en comparación con los síntomas de la transmisión vectorial del parásito. En esta investigación hemos llevado a cabo cuidadosamente la infección oral (MB) y la inoculación directa en el estómago mediante sonda gástrica (MG) de ratones, y la hemos comparado con la clásica inyección intraperitoneal (IP). Nuestros resultados indican que la mucosa gástrica parece ser una mejor puerta de entrada para el parásito que la cavidad oral. En este sentido, investigaciones realizadas por otros autores (5) sobre la transmisión oral de *T. cruzi* en el modelo murino, han reportado que la invasión está mediada por una interacción bioquímica del parásito con células de la mucina gástrica, evidenciando la participación de la glicoproteína gp 82 de los tripomastigotes en una relación ligando-receptor con las células de la mucosa. En nuestro caso, el infiltrado celular inflamatorio detectado en la lengua podría ser consecuencia de la penetración del parásito por esta vía. En efecto, la presencia de tripomastigotes libres y parásitos intracelulares (amastigotes y tripomastigotes) en el exudado peritoneal, 13 d.p.i. por vía oral, indica el tropismo del aislado AM-16 de *T. cruzi* por este nicho en la cavidad abdominal luego de su penetración y diseminación a partir de otros tejidos. Silva y col. (9), empleando tripomastigotes metacíclicos bioluminiscentes de *T. cruzi* cepa Dm28c, inoculados en la cavidad bucal, mostraron que los parásitos no colonizaron la lengua de los ratones BALB/c, mientras que sí se evidenciaron en la cavidad naso oral y en el estómago a los 21 d.p.i. (9). Estos autores proponen la cavidad nasal como puerta de entrada y de replicación inicial de *T. cruzi* luego de la infección oral. La ausencia o bajas

parasitemias reportadas por nosotros durante el período de postración sintomatológica de los ratones infectados, parece ser contradictoria. Sin embargo, esta conducta parasitológica ha sido reportada por otros autores con aislados venezolanos. El hallazgo más sorprendente en esta investigación lo constituyó la rápida y violenta recuperación del estado de postración de los ratones sobrevivientes (5 días) y que se mantuvo hasta el final de esta investigación.

En conclusión, la procedencia, edad (tiempo de infección) y tamaño del inóculo, la vía de inoculación, estadio y especie a inocular, son variables que deben ser consideradas y de las cuales dependerá el grado de virulencia de una cepa determinada. Nuestros resultados sugieren que la vía de inoculación del aislado AM-16, podría relacionarse directamente con el retraso observado en el día de detección de la parasitemia (MB=MG>IP) y con la aparición de los tripomastigotes en la cavidad abdominal (MB>MG>IP). No parece existir una relación directa entre sobrevivencia y parasitemia y sí hay una relación directa entre la sobrevivencia y la carga parasitaria en el corazón. Aunque en este trabajo no se determinó la carga parasitaria cardíaca, reportes anteriores de nuestro laboratorio con aislados silvestres del Valle de Caracas, han demostrado el tropismo cardíaco en ratones NMRI (3,8), por lo que planteamos que la mortalidad observada en nuestros experimentos pudiera estar relacionada con la presencia y aumento del número de parásitos en el corazón y el daño tisular que representa. Al contrario, la posible respuesta inmunológica durante la fase aguda inicial, podría haber contribuido a la recuperación clínica y a prolongar la vida de los ratones sobrevivientes, pasando a desarrollar una infección crónica. La vía de administración oral del parásito (mucosa bucal y gástrica) podría haber influido en la marcada disminución de peso inicial, sobre todo en el grupo MB, debido a la penetración de los parásitos a través de las mucosas, invasión y colonización de las células con la consecuente respuesta inflamatoria del sistema inmunológico. En este sentido, podríamos inferir que debido a los procesos inflamatorios observados en la cavidad bucal y estómago de los animales, la ingesta de alimento, así como la digestión, se vieron afectadas en el grupo inoculado en la cavidad bucal, influyendo en la pérdida de peso observada al inicio. La no detección de nidos de amastigotes pudo deberse al tiempo de toma de muestra, lo que nos conduce al planteamiento de nuevos experimentos en este sentido.

Referencias

1. Alarcón de Noya, B., Díaz-Bello, Z., Colmenares, C., Ruiz-Guevara, R., Mauriello, L., Muñoz-Calderón, A. y Noya, O. (2015). Update on oral Chagas disease outbreaks in Venezuela: epidemiological, clinical and diagnostic approaches. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **110**: 3.
2. Carrasco, H., Segovia, M., Londoño, J., Ortegoza, J., Rodríguez, M. y Martínez, C. (2014). *Panstrongylus geniculatus* and four other species of triatomine bug involved in the *Trypanosoma cruzi* enzootic cycle: high risk factors for Chagas' disease transmission in the Metropolitan District of Caracas, Venezuela. *Parasit Vectors*, **7**(602): 1-15.
3. Díaz Centeno, Lurian's. (2014). **Evaluación inmunoparasitológica de aislados venezolanos de *Trypanosoma cruzi* provenientes del ciclo peridoméstico de zonas urbanas del Distrito Capital, en el modelo murino de la enfermedad de Chagas.** Trabajo Especial de Grado. Escuela de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela, Caracas. Venezuela.
4. Díaz-Bello, Z., Zavala-Jaspe, R., Reyes-Lugo, M., Colmenares, C., Noya-Alarcón, O., Noya, O., Herrera, L. y Alarcón de Noya, B. (2016). Urban *Trypanosoma cruzi* oral transmission: from a zoonotic founder focus to the largest microepidemic of Chagas Disease. *SOJ Microbiol. Infect. Dis.*, **4**(1): 1-9.
5. Hoft, D.F., Farrar, P.L., Kratz-Owens, K. y Shaffer, D. (1996). Gastric invasion by *Trypanosoma cruzi* and induction of protective mucosal immune responses. *Infect. Immun.*, **64**: 3800-3810.
6. OMS. (2017). **La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana).** Nota descriptiva N° 340.
7. Sagasti Sánchez, J. (2017). **Comportamiento biológico del aislado venezolano AM-16 de *Trypanosoma cruzi*: estudio de la colonización de la mucosa bucal y gástrica en el modelo murino.** Trabajo Especial de Grado. Escuela de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela.
8. Sanoja, C., Díaz-Centeno, L., Guevara, P. y Payares, G. (2014). Ciclo peridoméstico de *Trypanosoma cruzi* en zonas urbanas del Distrito Capital: Infección experimental por vía oral empleando tripomastigotes obtenidos de la cavidad peritoneal de ratones. *NMRI*, **7**(1): 61-64.
9. Silva-dos-Santos, D., Barreto de Albuquerque, J., Guerra, B. y Moreira, O. (2017). Unraveling Chagas disease transmission through the oral route: Gateways to *Trypanosoma cruzi* infection and target tissues. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **11**(4): 1-26.

Zooplankton del embalse Petaquire (Edo. Vargas): Composición, abundancia y biomasa

OSCAR ZAPATA¹, ERNESTO J. GONZÁLEZ RIVAS², JOSÉ V. MONTOYA³, MARY PÉREZ³ Y
MARÍA D. MENDOZA³

¹Laboratorio de Limnología, Centro de Biología Celular
Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela
Calle Suapure, Colinas de Bello Monte, Caracas – Venezuela. Correo: olz2007@gmail.com

²Correo: ernesto.gonzalez@ciens.ucv.ve

³Laboratorio de Ecología Acuática, Centro de Ecología, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Carretera Panamericana, Kilómetro 11, Altos de Pipe, Caracas – Venezuela. Correo: j.v.montoya@gmail.com

El embalse Petaquire, construido en el año 1929, actualmente abastece de agua al sector oeste del Estado Vargas. Hasta la fecha, no ha habido un estudio referente a la comunidad planctónica ni sobre otros aspectos sobre sus características limnológicas. Por tal motivo, se propuso determinar las variaciones mensuales (julio 2015 – marzo 2016) de la abundancia y biomasa del zooplankton a diferentes profundidades (superficie, intermedio y fondo). Las muestras fueron tomadas cerca del dique con una trampa de Schindler-Patalas (12 litros), y preservadas con solución de formaldehído (concentración final 4%). La abundancia se determinó por conteo en cámaras de Sedgwick-Rafter (1 mL), mientras que la biomasa se estimó como peso seco tras desecar los organismos a 60°C por 20-24 horas y ser pesados en una ultramicrobalanza. La comunidad zooplanktónica estuvo dominada por los rotíferos, siendo *Keratella americana* y *Polyarthra remata* las especies dominantes. La abundancia promedio del zooplankton fue de 51 ind./L \pm 39, mientras que el promedio de biomasa fue de 38,8 μ g p.s./L \pm 11,4. La dominancia de los rotíferos, así como la presencia del copépodo *Thermocyclops decipiens*, aunado a los valores de abundancia y biomasa del zooplankton, son indicativos del proceso de eutrofización del embalse.

Introducción

El embalse Petaquire es el único lago artificial del Estado Vargas y fue construido en el año 1929 con el objetivo de regular el caudal del río Petaquire para aprovechamiento hidroeléctrico; actualmente su función es abastecer el sector oeste de los acueductos del estado Vargas, y en particular las poblaciones de Carayaca y Tarma (Castillo y col., 1973). A pesar de haber sido construido hace más de 80 años, hasta la fecha no se han realizado estudios referentes a la comunidad planctónica ni a sus características limnológicas.

En vista de lo anteriormente expuesto, y como parte del proyecto “Construcción colectiva de indicadores de salud humana”, adelantado por el Centro de Ecología del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) y el Laboratorio de Limnología del Instituto de Biología Experimental de la Universidad Central de Venezuela (UCV), se propuso como objetivo evaluar las variaciones mensuales en la composición, abundancia y biomasa del zooplankton en el embalse Petaquire.

Área de estudio

El embalse Petaquire está ubicado en la vertiente norte de la Cordillera de la Costa en el estado

Vargas (10°28'06,5"N, 67°09'13,2"W), a una altitud de 1300 m.s.n.m. (Fig. 1). Es una gran cuenca hidrográfica y por eso su conservación es una prioridad nacional debido a la importancia estratégica que ésta representa, por los servicios ambientales prestados y las actividades económicas que en ella se desarrollan. El área superficial del embalse es de 185.000 m². Su volumen aproximado es de 2.691.000 m³ en el nivel normal de operación y su profundidad media es de 14,5 m (1).

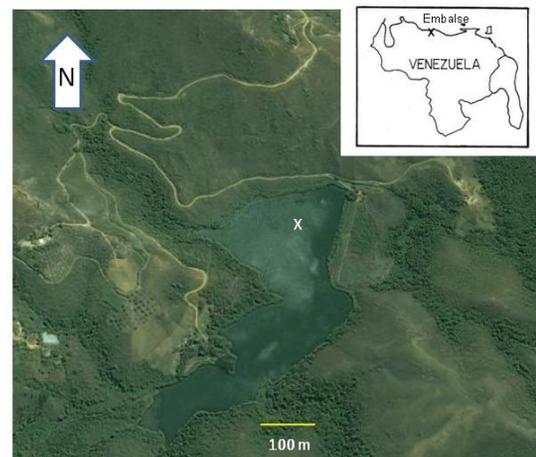


Fig. 1. Ubicación relativa del embalse Petaquire, mostrando la localidad de estudio (X).

Materiales y métodos

Las muestras fueron colectadas mensualmente de julio 2015 a marzo 2016 en una localidad cercana al dique del embalse, mediante el uso de una trampa de Schindler-Patalas (12 L de capacidad) en la superficie (0 m), nivel intermedio y fondo de la columna de agua. Los especímenes fueron preservados con una solución de formaldehído al 4% de concentración final.

La abundancia del zooplancton se estimó a partir del conteo de submuestras de 1 mL (por duplicado) en cámaras de Sedgwick-Rafter con la ayuda de un microscopio de luz (9). Por su parte, la biomasa total del zooplancton se estimó mediante la selección de todos los organismos contenidos en una alícuota de 0,1 mL y determinación del peso seco de los organismos luego de su desecación a 60°C en una estufa por un tiempo de 20-24 horas (2). El peso se determinó en una ultramicrobalanza Mettler M3 (precisión de 1 µg). Los análisis se realizaron por duplicado.

Resultados

Composición de la comunidad zooplanctónica. Se identificaron 10 taxones del zooplancton (**Tabla 1**), siendo los rotíferos el grupo más diverso con 6 especies. Las especies dominantes durante el período de estudio fueron *Keratella americana* y *Polyarthra remata*. Los protozoarios estuvieron representados por dos especies y el resto de los grupos estuvieron representados por una sola especie.

Tabla 1. Taxones del zooplancton identificados en el embalse Petaquire durante el período de estudio.

COPEPODA <i>Thermocyclops decipiens</i>
CLADOCERA <i>Diaphanosoma birgei</i>
ROTIFERA <i>Brachionus calyciflorus</i> <i>Filinia longiseta</i> <i>Hexarthra</i> sp. <i>Keratella americana</i> <i>Lecane</i> sp. <i>Polyarthra remata</i>
PROTOZOA <i>Centropyxis</i> sp. <i>Vorticella</i> sp.

En lo que respecta a los copépodos, se debe destacar que estos estuvieron representados por *Thermocyclops decipiens* (Copepoda, Cyclopoida), con un alto porcentaje de nauplios (larvas) y un bajo porcentaje de copepoditos (juveniles) y de adultos.

Abundancia del zooplancton. La **Fig. 2** presenta las variaciones de la abundancia del zooplancton en cada uno de los tres estratos de la columna de agua durante el período de estudio.

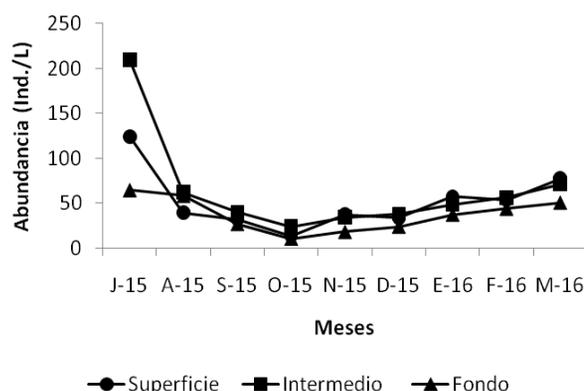


Fig. 2. Variaciones de abundancia del zooplancton en cada uno de los tres estratos de la columna de agua durante el período de estudio.

En promedio, la mayor abundancia se registró en el nivel intermedio (alrededor de los 6 m de profundidad), con 65 ± 56 Ind./L, seguida por el nivel superficial, con 52 ± 33 Ind./L, y finalmente el estrato profundo (alrededor de los 11 m de profundidad), con 37 ± 19 Ind./L. En todos los casos, los menores valores se presentaron durante el mes de octubre, mientras que los máximos valores se registraron durante el mes de julio. Los mínimos valores se detectaron en el estrato profundo, excepto durante agosto, cuando se registró en la superficie del cuerpo de agua, mientras que los máximos valores se observaron en el estrato intermedio, excepto en los meses de noviembre, enero y marzo. También pudo observarse que, con la excepción del mes de julio, hubo una homogeneidad relativa en la densidad de organismos zooplanctónicos a lo largo de la columna de agua durante el período de estudio.

La abundancia promedio del zooplancton en la columna de agua varió entre 16 y 133 Ind./L en octubre y julio, respectivamente, con un valor medio de media de 51 ± 34 Ind./L (**Fig. 3**).

En cuanto a las proporciones de los diferentes grupos del zooplancton, los rotíferos fueron dominantes a lo largo de todo el período de estudio, representando en promedio el 72,5% del total de la

comunidad, seguidos por los copépodos con el 21,9%, los cladóceros con el 4,7% y los protozoarios con el 0,9% del total (**Fig. 4**).

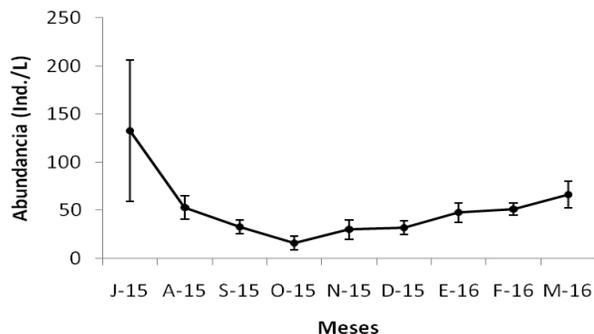


Fig. 3. Abundancia promedio del zooplancton en la columna de agua durante el período de estudio.

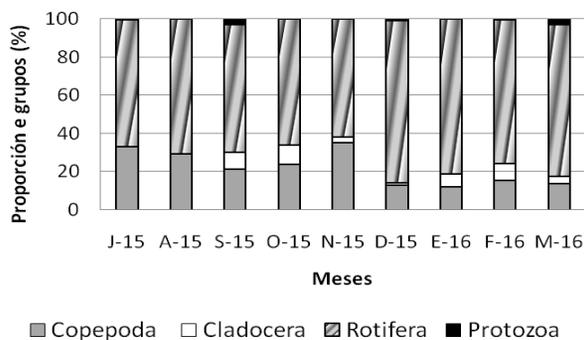


Fig. 4. Proporciones de los diferentes grupos del zooplancton durante el período de estudio.

Biomasa del zooplancton. Las variaciones de la biomasa del zooplancton en el embalse Petaquire se muestran en la **Fig. 5**. Puede apreciarse que las variaciones de biomasa presentaron una tendencia parecida a la de las variaciones de abundancia.

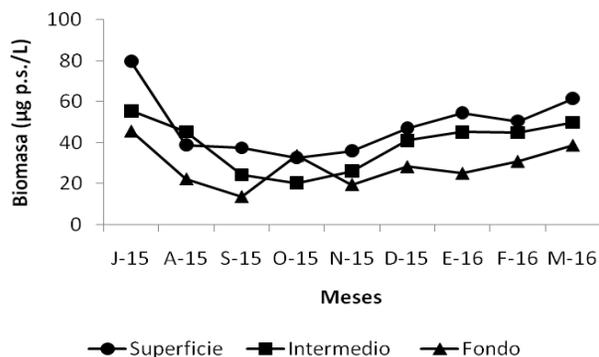


Fig. 5. Variaciones de biomasa del zooplancton en cada uno de los tres estratos de la columna de agua durante el período de estudio.

En promedio, los mayores valores de biomasa se registraron en el nivel superficial ($48,6 \pm 15,0 \mu\text{g p.s./L}$), seguidos del estrato intermedio ($39,2 \pm 12,6$

$\mu\text{g p.s./L}$) y del estrato profundo ($28,6 \pm 10,0 \mu\text{g p.s./L}$). Al igual que la abundancia, los menores valores de biomasa de los niveles superficial e intermedio se registraron en octubre, mientras que el menor valor del estrato profundo se registró en septiembre. Por su parte, para todos los estratos, los mayores valores se observaron en julio.

La **Fig. 6** muestra los valores promedios de biomasa considerando toda la columna de agua. Se notó la misma tendencia registrada para la abundancia del zooplancton, aunque el menor valor se registró en septiembre ($25,1 \pm 12,0 \mu\text{g p.s./L}$), mientras que el máximo valor se observó en julio ($60,3 \pm 17,5 \mu\text{g p.s./L}$). El promedio del período de estudio fue de $38,8 \pm 11,4 \mu\text{g p.s./L}$.

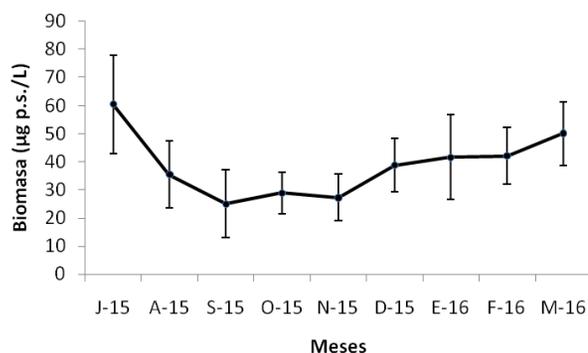


Fig. 6. Biomasa promedio del zooplancton en la columna de agua durante el período de estudio.

Discusión

Los embalses son sistemas complejos que presentan un patrón dinámico, cambios rápidos en los mecanismos de funcionamiento y gradientes horizontales y verticales (7). En ellos, el zooplancton es controlado por múltiples factores, entre los que destacan el tiempo de retención del agua, la depredación, la eutrofización y la entrada de pesticidas y herbicidas de sus cuencas de drenaje (5).

La comunidad de rotíferos presentó la mayor riqueza de especies, en concordancia a lo propuesto por varios autores que exponen que los rotíferos dominan las comunidades del zooplancton en lagos y embalses tropicales y subtropicales (5,6), todo ello debido a su estrategia de reproducción rápida bajo condiciones de estrés hidrodinámico, común en este tipo de ambientes. Así mismo, González y col. (3) encontraron que la dominancia de rotíferos sobre los otros grupos del zooplancton en embalses venezolanos se puede asociar a condiciones eutróficas. De modo similar, la presencia del copépodo *Thermocyclops decipiens* y del cladóceros *Diaphanosoma birgei* también se ha asociado a ambientes eutróficos (4,8).

A pesar de los valores de fósforo total mayores a 100 µg/L y de clorofila-*a* mayores a 20 µg/L (datos no publicados del proyecto), propios de sistemas eutróficos, y a pesar de la presencia de especies indicadoras de condiciones eutróficas, tanto los valores de abundancia como los de biomasa del zooplancton pueden considerarse de bajos a moderados, propios de condiciones entre oligotrófica y mesotrófica. Sin embargo, la observación “*in situ*” del uso de biocidas en las áreas circundantes del embalse y que pudieran estar llegando a sus aguas por escorrentía, pudiera explicar esta aparente discordancia entre estos valores y la condición eutrófica del sistema.

En este estudio, la abundancia y la biomasa del zooplancton presentaron tendencias similares en sus variaciones temporales, comportamiento que ya ha sido registrado en otros embalses venezolanos (3). De igual modo, estas variaciones parecieron supeditarse a las fluctuaciones de las condiciones ambientales y, tal como se ha expresado, al uso de biocidas en las vecindades del embalse.

Agradecimientos

Al FONACIT, por el financiamiento del proyecto “Construcción colectiva de indicadores de salud humana”.

Referencias

1. **Castillo, C., Gómez, J. y Montes, C.** (1973). **Embalses de Venezuela.** Serie El Agua, N° 1. Caracas.
2. **Edmondson, W.T. y Wingberg, G.G.** (1971). **A manual of methods for the measurement of secondary productivity in fresh waters.** International Biological Programme Handbook N° 17. Oxford.
3. **González, E.J., Matos, M.L., Peñaherrera, C. y Merayo, S.** (2011). Zooplankton abundance, biomass and trophic state in some Venezuelan reservoirs. En: **Biomass and Remote Sensing of Biomass.** Islam Atazadeh (Ed.). Published by InTech. Rijeka, Croacia: 57-74.
4. **Landa, G.G., Barbosa, F.A.R., Rietzler, A.C. y Maia-Barbosa, P.M.** (2007). *Thermocyclops decipiens* (Kiefer, 1929) (Copepoda, Cyclopoida) as indicator of water quality in the State of Minas Gerais, Brazil. **Braz. Arch. Biol. Technol., 50(4):** 695-705.
5. **Matsumura-Tundisi, T.** (1999). Diversidade de zooplancton em represas do Brasil. En: **Ecologia de reservatórios: Estrutura, função e aspectos sociais.** R. Henry (ed.). FAPESP e FUNDIBIO. Botucatu, SP: 39-54.

6. **Sendacz, S., Caleffi, S. y Santos-Soares, J.** (2006). Zooplankton biomass of reservoirs in different trophic conditions in the State of São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Biology, 66:** 337-350.
7. **Tundisi, J.G.** (1999). Reservatórios como sistemas complexos: Aspectos teóricos. En: **Ecologia de reservatórios: Estrutura, função e aspectos sociais.** R. Henry (ed.). FAPESP e FUNDIBIO. Botucatu, SP: 19-38.
8. **Villabona-González, S.L., Ramírez-Restrepo, J.J., Palacio-Baena, J.A. y Costa Bonecker, C.** (2015). Respuesta de la biomasa zooplanctónica a los gradientes de estado trófico y precipitación de un embalse tropical. **Rev. Acad. Colomb. Cienc. Ex. Fis. Nat., 39(152):** 374-388.
9. **Wetzel, R. y Likens, G.** (2000). **Limnological analyses.** 3rd edition. Springer. New York.

Conducta de aproximación las hembras de *Physalaemus pustulosus* y *Physalaemus fischeri* (Leptodactylidae) durante la fonotaxis en ambientes acústicos de complejidad creciente

ZAIDA TÁRANO MIRANDA

Laboratorio de Comportamiento Animal. Centro de Biología Celular.

Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela
Calle Suapure, Colinas de Bello Monte. Caracas - Venezuela. Correo: zaida.tarano@ciens.ucv.ve

Las vocalizaciones de los machos son la señal reproductiva primaria en muchas especies de anuros. Las hembras responden acercándose a los machos (fonotaxis). El análisis de las conductas durante la fonotaxis puede ser útil para determinar cuán “seguras” están las hembras de su decisión al iniciar el recorrido y si la revisan en el camino. Una hembra “indecisa” se aproximará a varios machos antes de hacer su elección e iniciará su recorrido en cualquier dirección respecto al macho elegido. La “indecisión” podría incrementarse con la complejidad del ambiente acústico o con la similitud entre los cantos percibidos. Aquí se evalúa la conducta de fonotaxis en dos especies de leptodactílidos (*Physalaemus pustulosus* y *Physalaemus fischeri*) en tres condiciones acústicas de complejidad creciente por medio de bioensayos en el laboratorio. Los resultados preliminares indican que las hembras inician su recorrido en la dirección “correcta” (i.e., hacia el canto que finalmente eligen) y que no se acercan al canto no elegido; sin embargo, los recorridos son más largos y sinuosos en las condiciones más complejas. Concluimos que las hembras han tomado una decisión al iniciar el recorrido, pero es revisada en función de la complejidad de la situación de elección.

Introducción

El laboratorio de Comportamiento Animal analiza la comunicación acústica en anuros como línea principal de investigación. Se abordan diferentes aspectos de la conducta vocal de los machos (10,13,14) y las preferencias de apareamiento de las hembras (12,15). También se exploran otros factores que afectan la evolución de las características de los cantos de anuncio de los machos (p.e., el ambiente de transmisión, la coexistencia con heteroespecíficos) (11). En el análisis de las preferencias de las hembras se utilizan comúnmente los bioensayos con playbacks (reproducción de cantos a través de altavoces). En estos experimentos el interés se centra en la elección que hacen las hembras (p.e., la fuente de sonido a que se aproximan). Sin embargo, la conducta de las hembras durante la fonotaxis típicamente se pasa por alto (algunas excepciones en 1,3,4,7), aunque puede ser muy importante para explorar otros aspectos de las decisiones reproductivas de las hembras. Por ejemplo, podemos examinar si las hembras evalúan a los machos de cerca (a menos de un salto de distancia), si evalúan a corta distancia a varios machos (quizá los vecinos más cercanos) antes de elegir a uno en particular, si se aproximan a los machos siguiendo rutas o recorridos directos o sinuosos, o si cambian la dirección de aproximación hacia un macho antes de llegar a él dirigiéndose a otro. Estos patrones pueden revelar elementos del sistema de toma de decisiones de las hembras, su motivación y cómo se actualiza la decisión a lo largo del recorrido en función de cambios en el entorno

acústico (1,4). Debemos tener presente que en anuros que forman coros (agregaciones de machos que vocalizan), la composición, el número de emisores y la ubicación espacial puede cambiar de un momento a otro, especialmente en especies que no defienden territorios reproductivos permanentes. De modo que, durante el recorrido hacia un macho que ha sido detectado a cierta distancia, puede comenzar a vocalizar o aparecer otro más atractivo e interferir con la decisión previa o incluso abolirla. El dinamismo de los coros favorece la evolución de sistemas de toma de decisiones que permitan actualizarlas. No obstante, la actualización también involucra costos para las hembras, en tiempo, energía y probabilidad de depredación, entre otros (5).

En este trabajo se evalúa la factibilidad de explorar la toma de decisiones de las hembras a través del análisis de la conducta de las hembras de dos especies de leptodactílidos, *Physalaemus fischeri* y *Physalaemus* (= *Engystomops*) *pustulosus* y durante bioensayos de elección dual (p.e., dos opciones acústicas disponibles); específicamente evaluamos el comportamiento de aproximación hacia los altavoces. Para ello, exponemos a las hembras a varios escenarios acústicos en los que se explora el efecto de la interferencia temporal de los cantos (caso *P. pustulosus*) y de la similitud entre cantos (caso *P. fischeri*) sobre su comportamiento de acercamiento. En cuanto al primer caso, sabemos que la interferencia incrementa la probabilidad de elecciones erróneas por las hembras (p.e., elegir un canto poco atractivo), las cuales tienen un costo reproductivo

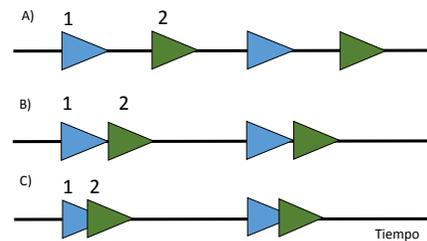
(p.e., aparearse con un macho de baja calidad, en un territorio pobre). En el segundo caso, la similitud entre los estímulos dificulta la discriminación de las diferencias y también puede derivar en decisiones subóptimas. Pensamos que un entorno acústico relativamente sencillo (sin interferencia o con grandes disimilitudes entre cantos) favorece la discriminación (diferenciación) de los cantos, facilita la toma de decisión temprana de la hembra y esto se reflejaría en su conducta de aproximación. Pensamos que la aproximación de la hembra sería más compleja cuanto más complejo el entorno acústico. Ahora bien, ¿cómo definimos la complejidad de la aproximación? Utilizamos tres criterios: la orientación del movimiento de inicio del recorrido de la hembra respecto a la posición del canto que finalmente elige, el número de giros o cambios de dirección que realiza durante el recorrido (la linealidad del recorrido), y el número de aproximaciones cercanas al altavoz antes de elegir. Específicamente, pensamos que cuanto más complejo sea el entorno, menos orientado será el inicio del movimiento (p.e., mayor sea el ángulo de inicio del recorrido), más sinuoso será el recorrido y más aproximaciones al altavoz serán necesarias antes de elegir.

En *P. pustulosus* utilizamos tres entornos de complejidad creciente: (a) sólo dos cantos coespecíficos perfectamente alternados sin ninguna superposición y (b) sólo dos cantos coespecíficos contiguos y (c) dos cantos coespecíficos parcialmente superpuestos (Fig. 1). Con *P. fischeri* analizamos el sistema de reconocimiento coespecífico en tres condiciones, de complejidad creciente (Fig. 2): (a) un canto conspecífico perfectamente alternado con un estímulo teóricamente neutro (esta condición presenta la menor complejidad porque hay un solo estímulo relevante), (b) un canto coespecífico alternado con uno de otra especie cercana filogenéticamente y alopatrida (*Physalaemus ephippifer*) (esta condición presenta dificultad mayor porque implica la discriminación de cantos que comparten atributos acústicos ancestrales), y (c) dos cantos coespecíficos con un coeficiente de similitud alto (CCC=0,985).

Métodos

Se utilizó una arena experimental construida en una habitación insonorizada, en la cual se colocaron dos altavoces ubicados en lados opuestos. Una hembra receptiva (capturada en amplexo y que no había desovado) se colocó bajo un recipiente, transparente acústica y visualmente, en el centro de la arena. El recipiente se retiraba accionando algún mecanismo remoto en un momento particular, de modo que la hembra podía moverse libremente en la arena (ver

detalles del método en 15). Los criterios para determinar que la hembra había realizado una elección dependieron de la conducta típica de la especie observada en campo: acercarse y esperar que el macho las abrace (15). Pevio a los bioensayos se



aclimataron las hembras a las condiciones experimentales durante un periodo de 30 minutos a 2 horas. Cada bioensayo duró 15 minutos como máximo.

Fig. 1. Arreglo temporal de los cantos utilizados en los bioensayos con *P. pustulosus*. Los cantos emitidos por los altavoces (1, 2) se muestran con colores diferentes. A) alternados, B) contiguos, C) superpuestos.

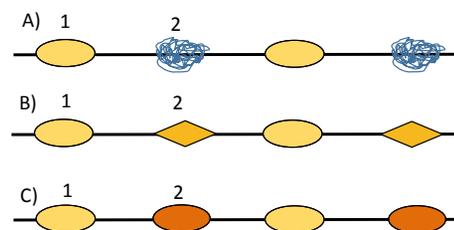


Fig. 2. Representación esquemática de los cantos utilizados en los bioensayos con *P. fischeri*. Los cantos emitidos por los altavoces (1, 2) se muestran con patrones diferentes. A) coespecífico, irrelevante, B) coespecífico, heteroespecífico, C) coespecíficos similares. Las combinaciones de formas y colores ilustran la similitud-diferencia entre cantos.

En el suelo de la arena experimental se dibujó una cuadrícula con coordenadas horizontales (eje x) y verticales (eje y), que permitían referenciar la posición y orientación de la hembra en una hoja de registro. Los registros se digitalizaron y se analizaron con el programa Maya®, diseñado para animación modelado y simulación digital. Hasta ahora, las variables medidas han sido: (a) orientación del movimiento inicial (derecha, izquierda, norte, sur) (el eje de ubicación de los altavoces se denominó arbitrariamente derecha-izquierda), etiquetada como +1 si se orientaba hacia el cuadrante con el altavoz elegido, -1 si era hacia el cuadrante contrario y como 0, si era hacia los cuadrantes perpendiculares; (b) número de cambios de dirección durante el recorrido; (c) la longitud total del recorrido, y (d) el número de acercamientos a cada altavoz. Para medir la longitud

del recorrido se utilizó una herramienta del programa que permite iterar pequeños segmentos del recorrido total y generar un valor global, y para medir el cambio de dirección se utilizó una escala ordinal. Para cada cuadro se registró si la dirección del movimiento se mantenía (se registra como 0), se orientaba al altavoz elegido (se registra como +1) o al altavoz no elegido (se registra como -1). Cuanto más sinuoso sea el recorrido mayor el número de cambios +1 -1, cuanto menos sinuoso, mayor el número de 0. Se espera que en situaciones de elección “sencillas”, el primer movimiento de la hembra sea en la dirección del altavoz que finalmente fue elegido, el recorrido sea más corto, se realicen menos acercamiento (o ninguno) al altavoz no preferido y el recorrido sea más rectilíneo (sin cambios o con pocos cambios de dirección) o menos sinuoso.

Resultados y discusión

Los resultados obtenidos hasta ahora (se describen cualitativamente) indican que la mayoría de las hembras de *P. pustulosus* inician su recorrido en dirección al altavoz elegido o en una dirección neutra, en todas las condiciones experimentales (82% de las hembras en promedio), evalúan el altavoz elegido una sola vez y permanecen cerca de él (70% de las hembras), y rara vez visitan el altavoz no elegido (95% de las hembras); sin embargo, realizan recorridos más largos y más sinuosos cuando los cantos se superponen (**Fig. 1C**) que en las condiciones más sencillas. La respuesta de las hembras de *P. fischeri* fue análoga: todas las hembras iniciaron el recorrido en dirección al altavoz elegido cuando tenían un único estímulo relevante (**Fig. 2A**), 90% lo hicieron cuando el canto coespecífico era emitido en alternancia con el heteroespecífico (**Fig. 2B**) y 70% cuando los cantos eran similares (**Fig. 2C**), y visitaron el altavoz no elegido al menos una vez (85% de las hembras) cuando los cantos eran similares (cantos coespecíficos); además, la sinuosidad del recorrido y la longitud fueron mayores cuando los cantos que percibían eran más similares entre sí (cantos coespecíficos) que cuando eran más disímiles (un canto coespecífico y otro heteroespecífico), condiciones en las que mostraron recorridos rectos desde el inicio en 90% de los casos.

Globalmente, la conducta de aproximación de las hembras de ambas especies sugiere ya han tomado una decisión cuando inician el movimiento; sin embargo, las diferencias en la longitud y sinuosidad del recorrido relacionadas con la complejidad de la tarea, sugieren que las hembras revisan o confirman esa decisión a media que sea cerca al emisor, por ejemplo, al cambiar su orientación y escucharlos

desde diferentes ángulos. Por supuesto, ésta no es la única explicación posible para la asociación entre la complejidad de la tarea y del recorrido. Por ejemplo, un entorno acústico complejo, como el modelado al superponer cantos, indica un mayor número de emisores y también se asocia a una mayor probabilidad de depredación porque los coros numerosos son más atractivos para los depredadores que los coros pequeños (9). Además, en un entorno natural complejo (pensamos que lo observado durante los bioensayos es una representación apropiada de lo que ocurre en la naturaleza), la probabilidad de perturbaciones por encuentros con otros machos o hembras, también aumenta, lo que promovería que las hembras actualicen la ruta de aproximación al macho regularmente. En condiciones naturales, dinámicas, la actualización del recorrido puede deberse a cambios en la composición y actividad del coro.

La toma de decisiones reproductivas se ha visto como un proceso en dos etapas: evaluar la señal y aplicar la decisión (16), pero esta visión ignora la iteración de lo ocurre mientras se ejecuta la decisión (p.e., actualización temporal de las señales). Los resultados de este trabajo indican que las hembras han tomado una decisión cuando inician el movimiento pero de ninguna manera sugieren que es un proceso cerrado desde su inicio. En estudios previos con *P. pustulosus* no se han observado inversiones en la dirección del movimiento en condiciones no dinámicas de emisión de cantos, esto es, cuando no se modifica el tipo de canto o su ubicación durante la expresión del recorrido de la hembra (3). Sin embargo, en condiciones dinámicas (p.e., cuando se modifica algún elemento del canto durante la fonotaxis), aproximadamente 50% de las hembras pueden responder a estos cambios súbitos, invirtiendo la fonotaxis si el canto elegido inicialmente ahora resulta menos atractivo que el canto con que se estaba contrastando (4).

En este trabajo también observamos que la mayoría de las hembras no se aleja del altavoz seleccionado después de hacerse acercado a él. En *P. pustulosus*, la hembra permanece inmóvil cerca del altavoz, muchas veces de espaldas (como cuando promueve que el macho inicie el amplexo axilar en el campo), o se mueve alrededor, sin separarse más de 2 ó 3 cm. En *P. fischeri* las hembras, además, tocan con las patas delanteras o traseras el altavoz, una conducta que también muestran en el campo (15). Este rasgo distintivo de la conducta de elección (mantenerse cerca) se ha denominado perseverancia (4) y es también un indicador del compromiso reproductivo

de la hembra y de su motivación (2,3). Las hembras jóvenes y los machos no muestran el mismo grado de perseverancia.

Por ahora, concluimos que es necesario complementar los bioensayos de fonotaxis con observaciones detalladas de la conducta de las hembras (8). Los detalles conductuales pueden ayudar en la interpretación de los resultados pero además sugieren nuevas variables a considerar para evaluar aspectos como: la motivación reproductiva y la repetitividad de las respuestas. Por ejemplo, la conducta errática de las hembras durante un bioensayo (repetidos cambios de dirección, múltiples acercamientos a los altavoces) puede indicar poca motivación reproductiva, y uno muy direccional lo contrario. Además, puede ayudar a decidir si una respuesta es consistente (p.e., repetible, la hembra volvería a escoger el mismo canto si se expone a la misma situación varias veces) y evaluar el efecto evolutivo (sobre los cantos) de estas respuestas, especialmente si la inconsistencia es un rasgo común en la población. En algunos trabajos previos, otros autores han encontrado que las hembras que están próximas a desovar y aún no han realizado una elección pueden ser permisivas en su respuesta, y elegir cualquier macho, tanto más cuanto menos tiempo tengan disponible (17), y que el riesgo de depredación también incrementa la probabilidad de mostrar respuestas permisivas y cometer errores (6). El análisis de la conducta de las hembras durante la fonotaxis emerge como un elemento indispensable en futuras investigaciones.

Referencias

1. Akre, K.L., y Ryan, M.J. (2010). Proximity-dependent response to variably complex mating signals in túngara frogs. *Ethology*, **116**: 1138-1145.
2. Baugh, A.T. y Ryan, M.J. (2009). Female túngara frogs varying commitment to mate choice. *Behav. Ecol.*, **20**: 1153-1159.
3. Baugh, A.T. y Ryan, M.J. (2010). The development of sexual behavior in túngara frogs. *J. Comp. Psych.*, **124**: 66-80.
4. Baugh, A.T. y Ryan, M.J. (2010). Mate choice responses to dynamic presentation of male advertisement signals in túngara frogs. *Anim. Behav.*, **79**: 145-152.
5. Bonachea, L.A. y Ryan, M.J. (2011). Predation risk increases permissiveness for heterospecific advertisement calls in túngara frogs, *Physalaemus pustulosus*. *Anim. Behav.*, **82**: 347-352.
6. Bonachea, L.A. y Ryan, M.J. (2011). Localization error and search costs during mate choice in túngara frogs, *Physalaemus pustulosus*. *Ethology*, **117**: 56-62.
7. Bosch, J., Márquez, R., y Boyero, L. (2003). Behavioural patterns, preference, and motivation of female midwife toads during phonotaxis tests. *J. Ethol.*, **21**: 61-66.
8. Gerhardt, H.C. (1992). Conducting playback experiments and interpreting their results. En: **Playback Studies of Animal Communication** (McGregor, P.K., ed.), Plenum Press, Nueva York: 59-77.
9. Gerhardt, H.C. y Huber, F. (2002). **Acoustic communication in insects and anurans: common problems and diverse solutions**. Univ. Chicago Press, Chicago.
10. Tárano, Z. (2002). Vocal responses to conspecific call variation in the Neotropical frog *Physalaemus enesefae*. *J. Herpetol.*, **36**: 615-620.
11. Tárano, Z. (2006). **Evaluación de la hipótesis de adaptación acústica ambiental en los anuros de una localidad de los Llanos Centrales de Venezuela**. Trabajo de Ascenso para optar a la categoría Agregado. Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela, Caracas.
12. Tárano, Z. (2015). Choosing a mate in a cocktail-party-like situation: the effect of call complexity and call timing between two rival males on female mating preferences in the túngara frog *Physalaemus pustulosus*. *Ethology*, **121**: 749-759.
13. Tárano, Z. y Fuenmayor, E. (2014). Complex vocal responses to conspecific calls in whistling frogs *Eleutherodactylus johnstonei*: playback experiments in the field. *Ethology*, **120**: 313-323.
14. Tárano, Z. y Carballo, L.C. (2016). Call intercalation in dyadic interactions in natural choruses of Johnstone's whistling frog *Eleutherodactylus johnstonei* (Anura: Eleutherodactylidae). *Behav. Process.*, **126**: 55-63.
15. Tárano, Z. y Herrera, E.A. (2003). Female preferences for call traits and male mating success in the Neotropical frog *Physalaemus enesefae*. *Ethology*, **109**: 121-134.
16. Valone, T.J., Nordell, S.E., Giraldeau, L.A. y Templeton, J.J. (1996). The empirical question of thresholds and mechanisms of mate choice. *Evol. Ecol.*, **10**: 447-455.
17. Witte, K., Chen, K-Ch., Wilczynski, W. y Ryan, M.J. (2000). Influence of amplexus on phonotaxis in the cricket frog *Acris crepitans blanchardi*. *Copeia*, **2000**: 257-261.

Propagación de bananos manzano (*Musa AAB*) y CIEN BTA-03 (*Musa AAAA*), mediante cultivos *in vitro* de ápices de yemas florales masculinas

EVA DE GARCÍA, TERESA E. VARGAS, AMALIA BRITO Y LUIS HERMOSO

Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Centro de Botánica Tropical
Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela
Calle Suapure, Colinas de Bello Monte. Caracas - Venezuela.
Correo: eva.cristina.garcia@mail.com

El banano es la fruta fresca más exportada del mundo (US\$ 10.000 mn/año). Es una fuente esencial de ingresos para miles de hogares rurales en los países en desarrollo, de ahí la importancia de implementar protocolos de multiplicación clonal eficientes para la producción masiva de esta fruta. En el trabajo analizaremos el crecimiento *in vitro* de ápices de yemas florales masculinas, de dos cultivares comerciales de banano, el guineo Manzano (*Musa AAB*) o “lady finger” y el CIEN BTA-03, obtenido en nuestro laboratorio, tetraploide (*Musa AAAA*) y resistente a Sigatoka. Los ápices florales fueron aislados y colocados en medios de cultivo con sales de Murashige y Skoog, vitaminas, sustancias de crecimiento, agar y azúcar. Los tejidos fueron incubados en una cámara de crecimiento a $30 \pm 2^\circ\text{C}$, bajo luz continua. El mayor desarrollo de los brotes fue en la combinación 5 mg/L de BA y 15% de agua de coco. A los 9 meses de cultivo, después de 3 repiques, se observó la producción de brotes, multiyemas y plantas completas. Se obtuvo un promedio de 30 brotes/explante para el cultivar CIEN BTA-03 y 12 brotes/explante en el cultivar Manzano. Las raíces se indujeron en medio MS sin sustancias de crecimiento.

Introducción

La fruticultura en Venezuela ocupa el tercer lugar dentro del sector agrícola vegetal. Existen 167.691 Ha de frutales y una producción 2.232.088 TM por año, siendo los principales: plátano y otros (577.146 TM), banano (470.594 TM), piña (452.654 TM) y naranja (309.929 TM), según FAOSTAT (3). De acuerdo a esta misma fuente de información, el banano ocupa la tercera posición en la producción de rubros vegetales detrás de la caña de azúcar (3.331.252 TM) y el maíz (1.465.379 TM). Es una fruta de alto consumo en nuestro país, pero se ha observado una gran disminución en la producción. En el año 2000, Venezuela ocupaba la posición 15 entre los veinte países de mayor producción en el mundo, y para el 2002 ya no estaba entre los veinte.

El banano se cultiva en todas las regiones tropicales y tiene una importancia fundamental para las economías de muchos países en desarrollo. En términos de valor bruto de producción, el banano es el cuarto cultivo alimentario más importante del mundo, después del arroz, el trigo y el maíz. El banano es un alimento básico y un producto de exportación. Como alimento, los bananos, incluidos los plátanos y otros tipos de bananos de cocción, contribuyen a la seguridad alimentaria de millones de personas en gran parte del mundo en desarrollo y, dada su comercialización en mercados locales, proporcionan ingresos y empleo a las poblaciones rurales.

Las variedades de banano tradicionalmente se propagan en forma vegetativa por cormos, pero uno de los principales problemas que presenta propagarlo convencionalmente es que la tasa de multiplicación es baja. Adicionalmente el banano es susceptible a diferentes tipos enfermedades causadas por hongos como Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) y Mal de Panamá (*Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*), bacterias como Hereque (*Ralstonia solanacearum*), y virus (1). Es por estas razones que en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto de Biología Experimental de la UCV, nos hemos dedicado desde el año 2000, a establecer en forma exitosa diferentes protocolos de multiplicación de banano *in vitro* basados en el uso de diversos tipos de explantes: meristemas y yemas vegetativas, escalpos y manos florales masculinas inmaduras (4,6,7,8); tipos y concentraciones variadas de sustancias de crecimiento (citocininas, auxinas y giberelinas) y diferentes métodos de cultivo *in vitro* (microesquejes, organogénesis y embriogénesis somática). En general, esos protocolos son altamente productivos, pero en la mayoría de ellos, la regeneración es mediante organogénesis y embriogénesis somática, ambas indirectas (exceptuando los cultivos de meristemas y de yemas vegetativas, que producen brotes en forma directa). Esos procesos de regeneración indirecta, se realizan a través de la formación de callo, lo que incrementa la probabilidad de la aparición de variantes somaclonales.

En la presente investigación reportamos la exitosa regeneración de los bananos Manzano y Cien BTA-03, mediante organogénesis directa, a partir del cultivo de ápices de yemas florales masculinas inmaduras. Adicionalmente, se describen aspectos de los procesos morfo anatómicas y se realiza una comparación morfológica de eventos que se observan en el cultivo *in vitro* de flores masculinas, en relación con los observados en el cultivo de ápices de yemas florales masculinas de ambas variedades.

Materiales y métodos

Se colectaron de yemas masculinas de ambos cultivares en Ocumare de la Costa, Estado Aragua. En el laboratorio, las mismas se redujeron a 3,5 cm de longitud, mediante la eliminación de las brácteas externas, se desinfectaron superficialmente con jabón y fueron llevadas a la cámara de flujo laminar, donde se esterilizaron con etanol al 70% por 5 minutos, y posteriormente lavados con agua estéril. Las inflorescencias de ambos cultivares se disectaron para obtener dos tipos de explantes: a) ápices de yemas masculinas inmaduras (1,5 cm) conteniendo yemas de flores cercanas al domo meristemático, y b) flores masculinas extraídas de manos situadas entre los nudos siete a dieciocho. Todos los explantes fueron inoculados en el medio de Murashige y Skoog (5) con la adición de mioinositol (100 mg/L), diferentes combinaciones de sustancias de crecimiento (6-bencil aminopurina, BAP y ácido naftaleno acético, ANA), agua de coco al 15%, agar (Difco), 8 g/L y azúcar (30 g/L). Los tejidos fueron incubados en una cámara de crecimiento a $30 \pm 2^\circ\text{C}$, bajo luz continua.

Las muestras de los diferentes tipos de tejido vegetal se transfirieron a frascos con etanol al 70% para su preservación. Se realizaron cortes transversales a mano alzada de los tejidos preservados, utilizando hojillas, los cuales fueron fijados con glicerina al 30%. Para las observaciones se utilizó un microscopio de luz Nikon 14 MLAB-2.

Resultados y conclusiones

Aspectos morfo anatómicos

Los tejidos de las flores masculinas inmaduras, en general, presentaron aumento de tamaño a las cuatro semanas de cultivo y luego de seis meses se observa la presencia de estructuras de diferentes formas y colores, como se puede observar en las **Figs. 1, 2, 3, 4 y 5**.



Fig. 1. Flores de banana Manzano. Se observa proliferación de tejido organogénico y brotes. Medio de cultivo con BAP y ANA.



Fig. 2. Cultivo de flores de banana Manzano donde se observa proliferación de callo embriogénico. Medio de cultivo con BAP, ANA y agua de coco.

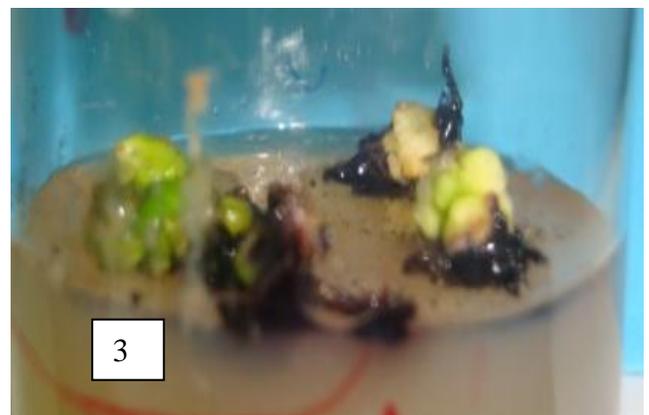


Fig. 3. Cultivo de flores del banana CIEN BTA-03. Se observan formaciones globulares blancas y verdes. Medio de cultivo con BAP y ANA.



Figs. 4 y 5. Cultivo de flores de CIEN BTA-03. Se observa formación de estructuras tubulares muy bien diferenciadas. Medio de cultivo con BAP, ANA y agua de coco.



Fig. 6. Cultivo de ápice de yema masculina de banano Manzano a los nueve meses de crecimiento. Se observa la producción de brotes y de plantas completas. Medio de cultivo con BAP y agua-coco.

Fig. 7. Corte transversal del ápice de un brote que muestra un solo meristemo.



Fig. 8. Cultivo del ápice de yema masculina inmadura de banano CIEN BTA-03, donde se muestra la formación de multiyemas que dan origen simultáneamente a varias plantas. Medio de cultivo con BAP y agua-coco.

Fig. 9. Corte transversal del ápice de multiyemas donde se observa la confluencia de varios meristemos.

En las **Figs. 1 y 2**, observamos el crecimiento de las flores masculinas del banano Manzano. La **Fig. 1**, nos muestra algunos vástagos, y además estructuras organogénicas la mayoría globulares de color verde y algunos de ellos posteriormente dan origen a

yemas mediante organogénesis indirecta. También se observan, pocas estructuras blancas y un callo marrón de superficie granulosa y brillante, los cuales proliferaron como callo.

En la **Fig. 2**, observamos la formación de un callo blanco embriogénico, con la presencia de algunos embriones somáticos que dieron posteriormente a plantas, mediante organogénesis indirecta.

En las **Figs. 3, 4 y 5**, se observa el desarrollo de las flores masculinas del banano CIEN BTA-03, después de nueve meses en cultivo. En algunas flores se formaron estructuras nodulares blancas y verdes, éstas últimas similares a estructuras organogénicas. También se observaron estructuras pequeñas, hialinas redondeadas (**Fig. 3**).

Adicionalmente, se observó en otros casos un proceso de diferenciación totalmente diferente, en el cual los tejidos de las flores desarrollaron estructuras tubulares de color verde claro (**Fig. 4**), que luego crecían manteniendo esa misma forma, con un opérculo en el extremo anterior (**Fig. 5**), similar a una flor masculina de banano *in vivo*, pero cuya función no pudimos determinar.

El cultivo del ápice de la inflorescencia de banano Manzano se observa en la **Fig. 6**, donde se muestran vitroplantas formadas a partir de los nueve meses de cultivo. En la **Fig. 7**, se muestra un corte transversal de un ápice de un brote, donde se observa un solo meristemo.

En la **Fig. 8** se observa el crecimiento del ápice de yema floral inmadura del banano CIEN BTA-03, después de nueve meses aparece la formación de multiyemas que dan origen simultáneamente a numerosas plantas. En la **Fig. 9**, se observa un corte transversal del ápice de una multiyema con varios meristemos presentes.

En relación a la actividad de inducción por las sustancias de crecimiento probadas en los medios: a) BAP (5 mg/L), b) BAP en combinación con agua de coco al 15%, c) la misma concentración BAP en combinación con ANA (1 mg/L), y c) las tres sustancias combinadas, en las concentraciones indicadas, se pudo observar que los tejidos florales de banano Manzano que presentaron embriones se cultivaron en medio con BAP, ANA y agua de coco. Sin embargo, las flores del banano CIEN BTA-03, en el mismo medio presentan las estructuras observadas en la **Figs. 4 y 5**.

Las flores de banano Manzano que se cultivaron con BAP Y ANA, presentaron el aspecto observado en la **Fig. 1**, las flores del banano CIEN BTA-03, cultivados en ese mismo medio presentan estructuras que se observan en el medio “c”.

El cultivo de los ápices de inflorescencia desarrolla yemas, vástagos y plantas completas en medios con BAP. Las vitroplantas obtenidas transferidas a envases plásticos acondicionados para tal fin que contenían mezcla de tierra abonada mezclada con arena y fueron aclimatizadas en un vivero con éxito obteniéndose una sobrevivencia del 100%.

Conclusiones

Este protocolo de propagación clonal mediante el cultivo de ápices de yemas florales inmaduras y la inducción de organogénesis directa, presenta varias ventajas con respecto a los otros protocolos desarrollados para banano, en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal:

1. El tiempo para la obtención de plantas completas, es de nueve meses, periodo relativamente corto.
2. La regeneración de nuevos brotes es directa, no hay formación de callo, disminuyendo la posibilidad de aparición de variantes somaclonales. Se induce la formación de multiyemas que dan origen a la neoformación de múltiples plantas, lo cual incrementa la eficiencia del método.
3. El mayor desarrollo de los brotes fue en la combinación 5 mg/L de BA y 15% de agua de coco. El cultivar CIEN BTA-03 produce 30 brotes por explante, lo cual demuestra que es eficiente, el mismo produce 2,5 veces más brotes por explante que el cultivar Manzano.

Este protocolo promete ser muy competitivo, combinado con el sistema de inmersión temporal, el cual permite transferir grupos pequeños de plantas a recipientes con medio líquido, con un sistema de aireación intermitente (2), cuya frecuencia difiere de acuerdo al cultivo, lo cual induce a incrementar la proliferación de nuevos vástagos.

Agradecimientos

Los autores agradecen al CDCH de la UCV, y al FONACIT, por el financiamiento de estas investigaciones.

Referencias

1. **Aular, J. y Casares, M.** (2011). Consideraciones sobre la producción de frutas en Venezuela.

Revista Brasileira de Fruticultura, 33(1): 187-198.

2. **Colmenares, M. y Giménez, C.** (2003). Multiplicación *in vitro* de *Musa* spp., mediante sistema de inmersión temporal. **Rev. Fac. Agron. (LUZ)**, 20: 468-477.
3. **FAOSTAT.** (2016). The Statistics Division of Food and Agriculture Organization. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>
4. **Hardy, I. y García, E. de.** (1994). Micropropagación de bananos (*Musa* AAA) del subgrupo Cavendish. **PHYTON**, 55: 31-41.
5. **Murashige, T. y Skoog, F.** (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant.**, 15: 473-497.
6. **Ramírez –Villalobos, M. y García, E. de.** (2008). Obtainment of embryogenic cell suspensions from scalps of the banana CIEN-BTA-03 (*Musa* sp., AAAA) and regeneration of the plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, 11(5): 1-10.
7. **Ramírez-Villalobos, M. y García, E. de.** (2009). Secondary Somatic Embryogenesis in Banana CIEN-BTA-03 (*Musa* sp. AAAA) and Regeneration of Plants. **Acta Hort.**, 829: 45- 50.
8. **Ramírez-Villalobos, M., García, E. de, Lindorf, H. y Finol, H.J.** (2013). Morphoanatomy and ultrastructure studies on embryogenic and non-embryogenic calluses of Williams banana (*Musa* sp.): I. Inmature male flowers. **Rev. Fac. Agron. (LUZ)**, 30: 341-366.

Aplicación de biotécnicas al cultivo de plantas de interés comercial

TERESA E. VARGAS¹, MICHELLE AMERUOSO L.¹, YANETZA LINARES¹, MARIANA ANDRADE¹,
LUIS HERMOSO², HÉCTOR BLANCO³ Y EVA DE GARCÍA¹

¹Laboratorio de Biotecnología Vegetal, ²Laboratorio de Clonación y Genética Vegetal, ³Laboratorio Ecofisiología de Xerófitas. Centro de Botánica Tropical, Instituto de Biología Experimental. Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. Apartado 47114. Caracas 1041A, Venezuela.
Correo: teoriedu@cantv.net

Solanum lycopersicum, *Allium sativum* L., *Ananas comosus* L. Merr Ecotipo Gobernadora son tres especies vegetales que han podido agregarse al Banco de Germoplasma *in vitro* que funciona en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto de Biología Experimental (IBE). Esto ha sido posible con el empleo de técnicas de cultivo de tejidos vegetales. Estas especies se sumarán al grupo de especies ornamentales, medicinales, industriales y hortícolas, ya existentes desde hace décadas y que se han mantenido a lo largo del tiempo, con repiques sucesivos del material vegetal a medios de cultivo fresco cada 2 meses, con el fin de tener material vegetal en condiciones de asepsia para futuras investigaciones o producción masiva.

Introducción

Cada año, se incorporan más especies vegetales de interés comercial al Banco de Germoplasma *in vitro* que funciona en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto de Biología Experimental (IBE) de la Facultad de Ciencias de la UCV, producto de las investigaciones dirigidas a dar solución de algunos problemas específicos en la agricultura del país. Estas investigaciones se basan en el Cultivo de Tejidos Vegetales, lo cual abarca un grupo de técnicas que consisten en el cultivo *in vitro* en condiciones asépticas de células, tejido u órganos vegetales (16).

Micropropagación de *Solanum lycopersicum* a partir de microesquejes

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es una planta herbácea perteneciente a la familia de las solanáceas, originaria de Suramérica que representa una de las especies vegetales más importantes del mundo debido a su valor económico y cultural, ya que es ampliamente usada como alimento fresco y/o procesada a nivel doméstico e industrial. Es además, una fuente importante de vitamina C, minerales como el fósforo y el potasio y carotenoides, como el licopeno y el β -caroteno (3). En Venezuela, las zonas de mayor siembra de tomate se encuentran en el estado Lara, Los Andes, Los Llanos Occidentales y el Centro del país, siendo la producción total para el año 2016 162.140 toneladas (4). El objetivo de esta investigación fue establecer un sistema de micropropagación masiva *in vitro* de *Solanum lycopersicum*.

Una vez germinadas *in vitro* las semillas de tomate, se aislaron microesquejes de una longitud aproximada de 1,5 cm. Los explantes fueron sembrados en distintos medios de cultivo. El medio M0 consistió en las sales de Murashige y Skoog (11) sin hormonas, mientras que el medio M1 estuvo constituido por las mismas sales y suplementado con 1 mg/L de ácido indolacético y 2,5 mg/L de benciladenina; por último, el medio M2 fue suplementado con 1 mg/L de ácido indolacético y 2,5 mg/L de cinetina. A todos los medios de cultivo usados en la investigación se les adicionó sacarosa a razón de 30 g/L, Tiamina 0,4 mg/L, MioInositol 100 mg/L, agar 8 g/L a pH 5,8.

En el medio M0, transcurridos 15 días, se observó un 30,77% de explantes respondiendo hacia el desarrollo de la yema preexistente, alcanzando longitudes promedio de 7,5 cm. En este tratamiento no hubo inducción de brotes *de novo* y se observó la presencia de numerosas raíces (>10) (**Fig. 1A**). En el medio M1, se observaron cambios morfológicos en los explantes a partir de los quince días, observándose la formación de brotes en 50% de los explantes sembrados. También se observó la formación de un callo de color marrón claro y de apariencia compacta en la base del 100% de los explantes. En un lapso de seis semanas de cultivo, se obtuvo un 80,77% de inducción de brotes y raíces a partir de los callos formados en la base de los explantes, con un promedio de 3,46 brotes/explante, alcanzando una altura promedio de 1,25 cm (**Fig. 1B**). Por otro lado, en el medio M2, al cabo de seis

semanas, se observó la formación de callos en el 100% de los explantes cultivados, a partir de los cuales en un 56,25% hubo inducción de brotes *de novo* y raíces, obteniendo un promedio de 1,25 brotes/explante. (Fig. 1C). Dados los resultados, el mejor medio para inducir brotes fue el medio M1, ocurriendo este proceso vía organogénesis indirecta.

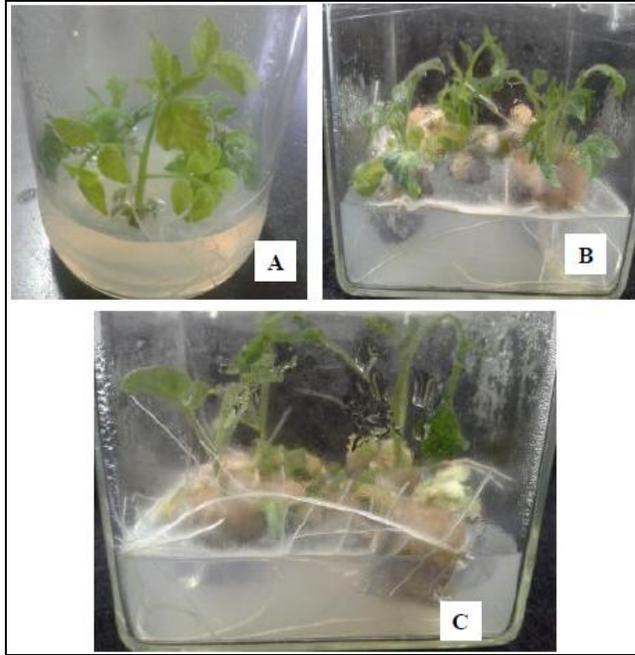


Fig. 1. A) Microesquejes desarrollados en medio de cultivo M0. B) Microesquejes desarrollados en medio de cultivo M1. C) Microesquejes desarrollados en medio de cultivo M2. En las figuras 1B y 1C se observa la formación de un callo con inducción de brotes y raíces. Todas las plantas poseen un mes de edad.

Estudio morfo-anatómico de bulbos de ajo (Allium sativum L.) formados in vitro

El ajo (*Allium sativum* L.) es una planta herbácea y de reproducción vegetativa perteneciente a la familia de las Amaryllidaceae (7,15). Esta especie capaz de formar un bulbo (estructura subterránea de reserva de nutrientes) (14), es originaria de Asia Central (5) y su demanda a través de los años ha incrementado drásticamente debido a la amplia gama de beneficios que proporciona su consumo fresco. En Venezuela, la producción total para el año 2016 fue de 13.897 toneladas (4), siendo los principales estados productores Mérida, Táchira y Trujillo (6).

El objetivo del presente estudio consistió en caracterizar morfo-anatómicamente bulbos de ajo formados en plantas cultivadas *in vitro*, a través de cortes anatómicos realizados durante distintas etapas del proceso de formación de la estructura.

La formación de bulbos *in vitro* fue posible gracias al cultivo de vitroplantas de ajo en medio sólido (de bulbificación, tomado de Mujica y Mogollón (9) constituido por las sales minerales de Murashige y Skoog (11), Tiamina y Mioinositol (0,4 y 100 mg.L⁻¹), sacarosa al 9% y 2 isopenteniladenina (2-ip) 2,0 mg.L⁻¹. Se realizaron estudios a los 0 días (edad 1), 10 días (edad 2), 19 días (edad 3) y 62 días (edad 4).

Los cortes longitudinales realizados en muestras de edad 1 (Fig. 2A), permitieron corroborar la naturaleza envolvente de las hojas, las cuales se superponen originando un pseudotallo de grosor constante desde su base (punto donde surgen las raíces). La posterior tinción con azul de toluidina resaltó la vascularización en el tallo verdadero, con entrenudos muy cortos y del cual parten las hojas. Las observaciones realizadas en estos explantes coinciden con las características de una planta joven, donde no se han iniciado cambios morfo-anatómicos productos del proceso de bulbificación.

El material vegetal correspondiente a las edades 2 y 3 (Fig. 2B), mostraron características morfológicas y anatómicas similares entre sí. En este sentido, se evidenció el engrosamiento uniforme en la base del pseudotallo, el cual presentó un cambio de color de las túnicas externas pasando de tonalidades verdosas a blancas traslúcidas a medida que avanzó el tratamiento. Lo anterior indica la pérdida progresiva de cloroplastos en las hojas protectoras a medida que se alcanza la madurez durante la bulbificación (8). Los cortes mostraron el engrosamiento de las hojas más internas, distinguiéndose zonas densas que parecen corresponder a los “dientes” o bulbillos que conformarán el bulbo, los cuales emergen de las yemas axilares de las hojas fértiles (internas). Más aún, el número de zonas densas o núcleos aumentó de 2 a 3 en muestras de edad 3 (en comparación a aquellos de edad 2).

Por último, a diferencia de las muestras anteriores, la parte aérea de las vitroplantas de edad 4 mostraron marchitez en sus extremos apicales; además el bulbo presentó un mayor diámetro promedio así como una tonalidad opaca en las hojas o túnica externas. Contrario a lo esperado, los cortes revelaron la formación de un único diente completamente desarrollado y maduro, indicado por la presencia de un meristema o yema axilar en la base del mismo (Fig. 2C). La tinción de las muestras, permitió detallar la presencia de yemas adicionales poco desarrolladas en la base del bulbo (tallo verdadero),

las cuales se disponían a lo largo del tallo entre las capas medias.

Los bulbos compuestos por múltiples dientes o tipo “multidentados” son el resultado de la bulbificación en plantas que han alcanzado una talla considerada como madura, mientras que los bulbos de tipo “unidentados” (compuesto por un único diente), ocurren por lo general en plantas jóvenes y pequeñas, siendo frecuentes en los bulbos formados a partir de plantas *in vitro* (12). Sin embargo, dicho fenómeno puede ser revertido al mantener a las plantas “unidentadas” bajo condiciones de vivero debido a que la etapa de letargo se encuentra asociada al balance endógeno de promotores e inhibidores de crecimiento (fitohormonas) (10,12).

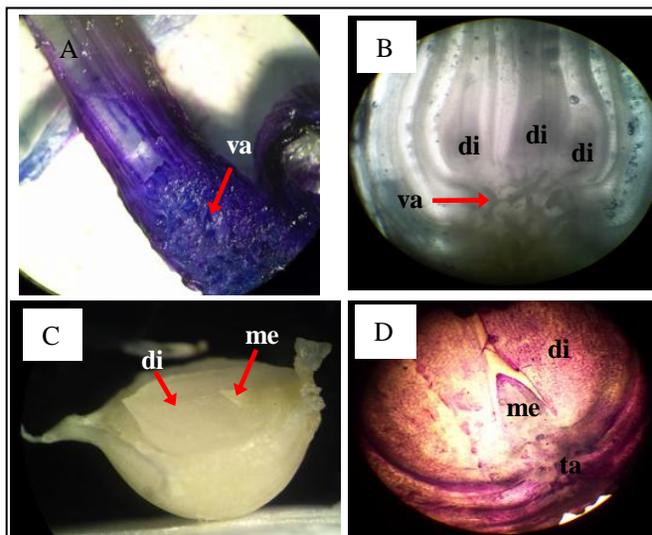


Fig. 2. A) Corte longitudinal de vitroplanta de edad 1 observado bajo lupa (2,0x); se señala la vascularización (va) presente en el tallo verdadero (flecha roja). B) Vista bajo lupa (3,5x) de explante de edad 3 donde se observan tres dientes (di) en formación y la vascularización. C y D) Detalle bajo lupa (2,5x) y microscopio (100x) óptico de bulbos de edad 4 formados por un único diente y meristema (me), se señala el tallo (ta).

Estrategia de trabajo para el control de la contaminación en el cultivo in vitro de piña (Ananas comosus L. Merr).

La piña (*Ananas comosus*), es considerada como una de las frutas más finas de las regiones tropicales. En la actualidad es conocida y estimada por todo el mundo, aunque su cultivo se limita a las regiones tropicales y subtropicales (13). En Venezuela, la piña es uno de los frutos autóctonos que ha mantenido su aceptación y conservado su cultivo, compitiendo con otras frutas exóticas (2). La contaminación por microorganismos es la causa más importante de pérdidas en laboratorios comerciales y de investigación de cultivo de células y tejidos vegetales (1).

En el cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, es indispensable evitar la contaminación con microorganismos, ya que estos pueden destruir los explantes, retrasando su desarrollo al competir con ellos y causar modificaciones en el medio de cultivo, lo cual afecta su supervivencia y desarrollo (14). Esta contaminación puede tanto provenir del tejido vegetal usado como explante, como ser introducida durante su manipulación.

Durante el intento de realizar la multiplicación de brotes de piña mantenidos *in vitro*, se observó una aparente y abundante contaminación por hongos y bacterias. Una manera de lograr el control de la contaminación es realizando cambios en las condiciones del medio de cultivo, tales como adición de sustancias nutritivas, cambios en el pH o cambios en la consistencia y en la constitución del medio (1).

Teniendo en cuenta este problema, se definió como objetivo evaluar métodos para la prevención y el control de la contaminación en el cultivo *in vitro* de piña ecotipo “Gobernadora”. La consistencia del medio de cultivo para la multiplicación *in vitro* de las plantas se modificó, pasando los explantes de medio líquido a sólido.

Inicialmente, se contaba con 7 fiolas con numerosos brotes contenidos en cada una de ellas (**Fig. 3A**). Los brotes se separaron para su multiplicación, obteniéndose un total de 61 explantes. Luego de los dos intentos de multiplicación, en la semana tres, se apreció un 100% de contaminación (**Fig. 3B**). Al presentarse la contaminación por segunda vez consecutiva en todos los explantes, se realizó otro proceso de desinfección y se procedió a sembrar los explantes desinfectados en medio sólido, esto bajo el supuesto de que se podría lograr el control de la contaminación al realizar algún cambio en los parámetros de cultivo (14).

Luego del paso de los explantes a medio sólido, en la quinta semana, se registró una disminución en el porcentaje de contaminación, siendo el mismo de 45,90%. En tal sentido, se procedió nuevamente a realizar la desinfección de los explantes y su paso a un nuevo medio sólido (**Fig. 3C**).

Pasadas dos semanas, no se registró contaminación alguna, por lo que se procedió a realizar un tercer intento de multiplicación en medio líquido (**Fig. 3D**), con lo cual también se evaluaría si se logró erradicar la contaminación. Finalmente, luego de dos semanas en medio líquido, no se registró contaminación en los explantes, resultado que se

mantuvo hasta la décima semana. Esto sugiere que el proceso basado en el cambio de medio de cultivo, pudiera constituir una estrategia eficaz para el control de la contaminación.

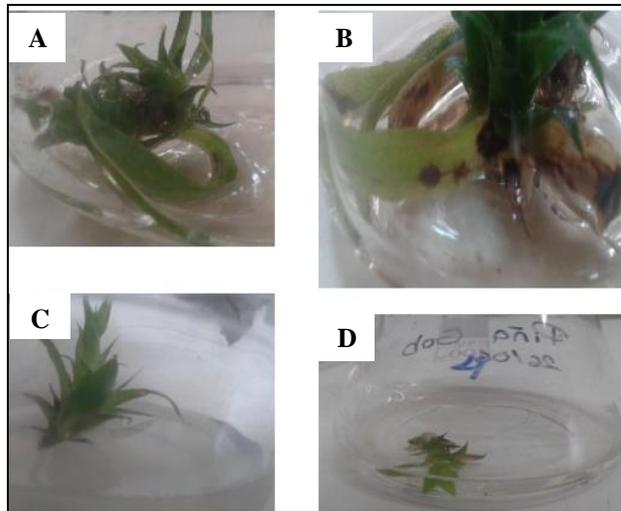


Fig. 3. Vitroplantas de piña. **A)** Planta con numerosos brotes. **B)** brote contaminado en medio líquido. **C)** Brote en medio sólido. **D)** Brote sano en medio líquido.

Referencias

1. **Alvarado, Y., Cruz, M., Portal, N., González, L., García, M., Quiala, E. y Gómez, R.** (2003). Estrategia de trabajo para la prevención y el control de la contaminación bacteriana en la micropropagación de la caña de azúcar. **Biotec. Veg.**, **3**(2): 77-82.
2. **Blanco, H., Vargas, T. y García, E. de.** (2011). Micropropagación clonal de tres variedades de piña nativas de la región amazónica mediante el cultivo de yemas axilares y apicales. **Interciencia**, **36**(6): 437-443.
3. **Cruz, A., López, J., Reyes C., López, M. y Valdez, A.** (2009). Establecimiento de un sistema de micropropagación *in vitro* de tomate (*Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom). Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad Autónoma de Sinaloa; Programa Regional de Doctorado en Biotecnología, FCQB-UAS; CIIDIR-IPN, Unidad Sinaloa.
4. **FAOSTAT.** (2017). Recuperado el 11 de julio de 2018 de KnoemaProduction Statistics-Crops, Crops Processed: <http://www.knoema.es>
5. **FDA.** (1995). Cultivo de ajo. Fundación de Desarrollo Agropecuario, INC. **Boletín Técnico N° 5**: 1-19.
6. **INIA.** (2005). El cultivo de Hortalizas en Venezuela. **Serie Manuales de Cultivo, N° 2**: 121-137.
7. **ITIS.** (2018). Integrated Taxonomic Information System. Recuperado el 26 de marzo de 2018 de

Integrated Taxonomic Information System on-line database: <https://www.itis.gov>

8. **Mann, L.** (1952). Anatomy of the garlic bulb and factors affecting bulb development. **Hilgardia**, **21**(8): 195-253.
9. **Mujica, H. y Mogollón, N.** (2004). Bulbificación *in vitro* del ajo (*Allium sativum* L.) con adición de citocininas y sacarosa en el medio de cultivo. **Bioagro**, **16**(1): 55-60.
10. **Mujica, H., Sanabria, M., Mogollón, N. y Perozo, Y.** (2008). Formación *in vitro* del bulbo de ajo morado (*Allium sativum* L.). **Rev. Fac. Agron. (LUZ)**, **25**: 197-210.
11. **Murashige, T. y Skoog, F.** (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant.**, **15**: 473-479.
12. **Nagakubo, T.; Takaichi, M. y Oeda, K.** (1997). I. Micropropagation of *Allium sativum* L. (garlic). **Springer**, **39**: 3-19.
13. **Pichardo, Y.** (2003). Comportamiento de plantas *in vitro* de piña (*Ananas comosus*), c.v MD2 a diferentes tiempos e intensidades de iluminación en fase de aclimatización. **TDD**: 1-49.
14. **Sánchez, M. y Salaverría, J.** (2004). Control de la contaminación y la oxidación en el cultivo *in vitro* de fresa (*Fragaria X ananassa* Duch). **UDO Agrícola**, **4**(1): 21-26.
15. **UniProt.** (2018). The Universal Protein Resource. Recuperado el 26 de marzo 2018 de Supporting data, taxonomy: <https://www.uniprot.org>
16. **Weisz, P. y Fuller, M.** (1972). **Tratado de Botánica.** Ciudad de México, México: Compañía Editorial Continental, S.A., p 279.

Importancia del explante inicial para la inducción de embriogénesis somática en café *Coffea arabica* L.

ANDREA MENÉNDEZ-YUFFÁ Y LUIS HERMOSO-GALLARDO

Laboratorio de Clonación y Genética Vegetal, Centro de Botánica Tropical, Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela, Calle Suapure, Colinas de Bello Monte, Caracas-Venezuela. Correo: andrea.menendez@ciens.ucv.ve

El café *Coffea arabica* L. es un cultivo de importancia agrícola en todo el mundo. Tradicionalmente, Venezuela ha sido un país productor de un café de excelente calidad. La inducción de embriogénesis somática en café es el método de preferencia para la propagación masiva de plantas élite, mejoradas e híbridos. Sin embargo, por ser una planta de ciclo largo, muchas veces el material debe ser seleccionado en campo, por lo cual los tejidos iniciales requieren condiciones particulares para lograr el objetivo final exitosamente. En el presente reporte, se presentan los resultados de aplicar un tratamiento con los fungicidas Ridomil® o KOCIDE® como parte del procedimiento de desinfección para el establecimiento *in vitro*, así como también el efecto del tiempo (0, 1 y 2 días) y condiciones de almacenamiento de las hojas (órgano que es la fuente de explantes) sobre la contaminación, crecimiento *in vitro* e inducción de embriogénesis somática. Los fungicidas aplicados no mejoraron el control de contaminación por hongos de los explantes. Las hojas pueden mantenerse en buen estado de conservación y potencial cultivo *in vitro* hasta dos días; sin embargo, las hojas almacenadas durante un día, presentaron una tendencia hacia una menor contaminación y mayor frecuencia de embriogénesis.

Introducción

El café *Coffea arabica* L. es un cultivo de importancia agrícola en todo el mundo. Los métodos de cultivo de tejidos, permiten la obtención masiva de individuos élite, híbridos, productos de mejoramiento y variedades selectas y son útiles en la preservación de germoplasma. El establecimiento y mantenimiento *in vitro* requiere que los tejidos sean despojados de contaminantes biológicos y su mantenimiento aséptico, ya que el control de contaminantes es esencial el establecimiento *in vitro* y evita pérdidas de germoplasma en cultivo. Cassells (1) piensa que la alta disponibilidad de nutrientes que contiene el medio de Murashige y Skoog (5), utilizado universalmente en los cultivo de tejidos vegetales, es un factor que favorece la contaminación microbiana de los cultivos. Adicionalmente hay diversos factores que afectan la contaminación de los cultivos *in vitro*, entre ellos el principal es la condición fisiológica y fitosanitaria de las plantas madres.

En el presente reporte, se muestra el efecto de utilizar un paso donde se aplica un tratamiento con los fungicidas Ridomil® o KOCIDE® durante la desinfección de las hojas de café, y se reportan los resultados de varios años de experimentación, en los cuales se ensayó el almacenamiento de hojas durante varios días (0, 1, 2 y 3) antes del aislamiento de los explantes para determinar su efecto en la capacidad de respuesta *in vitro* de los tejidos. Estos últimos experimentos derivaron en la evaluación de otros

efectos no previstos inicialmente, ya que se observó que el tiempo de almacenamiento afectó la contaminación y también la capacidad embriogénica de los explantes, cuyos resultados se presentan en el presente reporte.

Materiales y métodos

Se utilizaron hojas de plantas de café de las variedades Catimor y Catuai, jóvenes y sin lesiones, las cuales fueron desinfectadas y sembradas *in vitro* en un medio constituido básicamente por las sales de Murashige y Skoog (5) diluidas a la mitad, y 100 mg/L de mio-Inositol, 10 mg/L de Tiamina-HCl, 35 mg/L de Cisteína, 30 g/L de sacarosa y hormonas vegetales, según los procedimientos previamente descritos por Menéndez-Yuffá y García (4). Se evaluó el efecto de los fungicidas Ridomil (3 g/L) y KOCIDE (1 g/L) en el procedimiento de desinfección de las hojas y se ensayaron 3 tiempos (0, 1 y 2 días) de almacenamiento de la hojas en bolsas plásticas con agua después de cosechadas y se estudió su efecto sobre la contaminación, crecimiento *in vitro* e inducción de embriogénesis somática.

Resultados y discusión

Efecto del uso de fungicidas en la desinfección sobre la contaminación de los explantes

En la **Tabla 1** se resumen los resultados de aplicar un tratamiento con fungicidas durante el procedimiento de desinfección, cuando no se usaron fungicidas los

explantos se contaminaron en promedio en un 45 %, mientras que agregando el tratamiento con los fungicidas Ridomil® o Kocide®, la contaminación fue en promedio de un 62% y 63%, respectivamente.

Tabla 1. Efecto del tiempo de almacenamiento y los fungicidas sobre la contaminación de explantes de café Catimor y Catuai.

Variedad	Nº de días de almacenamiento	Tratamiento con fungicida	% contaminación
Catimor	0	sin fungicida	90
Catuai	0	sin fungicida	0
Catimor	0	Kocide	80
Catuai	0	Kocide	30
Catimor	0	Ridomil	40
Catuai	0	Ridomil	100
Catimor	1	sin fungicida	50
Catuai	1	sin fungicida	30
Catimor	1	Kocide	30
Catuai	1	Kocide	60
Catimor	1	Ridomil	30
Catuai	1	Ridomil	10
Catimor	2	sin fungicida	100
Catuai	2	sin fungicida	0
Catimor	2	Kocide	100
Catuai	2	Kocide	73
Catimor	2	Ridomil	100
Catuai	2	Ridomil	100

Los resultados muestran que el tratamiento con los fungicidas Ridomil® y Kocide® en el procedimiento de desinfección de hojas, no afectó positivamente el control de la contaminación de los explantes, independientemente del tiempo de almacenamiento, indicando hay que continuar trabajando con este problema y ensayar métodos diferentes. Los resultados muestran que el tratamiento con los fungicidas Ridomil® y Kocide® en el procedimiento de desinfección de hojas, no afectó positivamente el control de la contaminación de los explantes, independientemente del tiempo de almacenamiento, indicando hay que continuar trabajando con este problema y ensayar métodos diferentes, en tal sentido, Lazo-Javalera *et al.* (3), refieren que la presencia de cepas resistentes, reduce la efectividad de los fungicidas para el control de contaminación por hongos, es por ello, que ellos ensayaron el uso de isotiocianatos para la desinfección de yemas de uva, sin embargo, el uso de dichos compuestos no resultó

efectivo debido a la fitotoxicidad que se manifestó en oscurecimiento de las yemas y falta de desarrollo de los tejidos tratados. Por lo tanto, éste sigue siendo un factor a tener en cuenta, aunque es frecuente que no se disponga de las condiciones para poder controlarlo, pero sí puede mejorarse. En el experimento realizado también se observó que, en promedio, la contaminación de la variedad Catimor fue de un 69% y la de la variedad Catuai fue de un 45%. Consideramos que este resultado puede deberse a las diferentes condiciones fisiológicas y fitosanitarias de estas plantas, ya que las Catuai son más jóvenes que los Catimores y este factor puede afectar la respuesta *in vitro* y la contaminación, en particular y relacionado con este resultado, las plantas más viejas tienen mayor probabilidad de acumular contaminantes, sean fitopatógenos o no, y pensamos que este factor puede estar incidiendo en la respuesta observada.

Efecto sobre la contaminación del tiempo de almacenamiento de las hojas antes de la siembra

En la **Tabla 1** se muestran los resultados del efecto que tienen los días de almacenamiento previos a la siembra sobre la contaminación, en promedio se contaminaron el 56,7% de los explantes incubados por 0 días antes de la siembra, 35% de los explantes almacenados durante 1 día y 66,5% de los almacenados durante 2 días (**Fig. 1**). Este resultado no se esperaba y realmente el experimento se inició con el fin de determinar el tiempo que podían almacenarse las hojas cosechadas antes de la siembra, cuando no se encontraban cerca del laboratorio. Aunque este resultado es un promedio de varios experimentos y la diferencia no siempre es tan notoria, sí se observa una tendencia a que la contaminación sea menor cuando las hojas han estado almacenadas durante un día. Consideramos que el efecto puede deberse a que durante este tiempo, se permite la germinación de esporas de hongos pero no su proliferación, haciendo que éstas queden más expuestas facilitando su eliminación durante el proceso de desinfección. Söndhal *et al.* (6) señalan que la esterilización superficial de las hojas es mucho más difícil si las plantas de café están creciendo en el campo, e indican un procedimiento que les ha dado cierto grado de éxito para el material de campo: incubación de las hojas durante 30 minutos en hipoclorito de sodio al 2,6%, enjuague con agua estéril, incubación en placas de Petri selladas durante la noche, seguido de otra exposición a hipoclorito de sodio 2,6%, y luego enjuagar 3 veces con agua estéril antes de sembrar; la siembra la realizan en placas de Petri, pre-cultivando los explantes durante 3 días, para seleccionar los explantes viables y la eliminación de los

contaminados. Respecto a lo último, en experiencias previas hemos ensayado el sistema de pre-cultivo, pero dicho método no ha permitido separar los explantes contaminados y finalmente al cultivar en placas, algunas esporas de hongos germinan después de los 3 días y terminan contaminando todos los explantes de la placa, por lo cual preferimos cultivar un solo explante por envase; sin embargo, llama la atención que los autores recomiendan desinfectar las hojas con cloro antes y después de pre-incubarlas durante una noche, que se parece a la situación que ensayamos en este trabajo, aunque en el presente trabajo, las hojas no fueron desinfectadas previamente.

Efecto de los días de almacenamiento sobre la frecuencia de embriogénesis y la alta frecuencia de embriogénesis

En la **Tabla 2** se presentan los resultados del experimento de los días de almacenamiento, respecto a la inducción de embriogénesis somática en baja y alta frecuencia. El mayor porcentaje de explantes embriogénicos en baja y alta frecuencia se encontró en promedio en las hojas almacenadas durante un día, seguidas por aquéllas sembradas inmediatamente después de cosechadas (**Fig. 2**), disminuyendo notablemente en las hojas almacenadas durante 2 y 3 días. Una explicación a esta respuesta es que el día de almacenamiento está produciendo un estrés adicional a los tejidos que favorece el proceso de embriogénesis somática. En tal sentido, Ikeda y Zavattieri (2,7) señalan que la embriogénesis somática es generalmente favorecida por condiciones de estrés; pensamos que a tiempos mayores (2 y 3 días) de incubación, los procesos de senescencia, perjudican los tejidos en su viabilidad para reaccionar al cultivo y especialmente para expresar su potencial embriogénico.

Tabla 2. Efecto de los días de almacenamiento sobre la frecuencia de embriogénesis y la alta frecuencia de embriogénesis

Días de almacenamiento	% embriogénico	% altamente embriogénico
0	36,9	25,6
1	46,4	39,3
2	17,5	9
3	12,5	5

Conclusiones y recomendaciones

La adición de un tratamiento con los fungicidas Kocide® y Ridomil® al proceso de desinfección de las hojas de café, no mejoró el control de contaminación por hongos de los explantes.

El tiempo de almacenamiento de las hojas antes de la siembra *in vitro*, afectó la contaminación de los explantes, siendo óptimo el almacenamiento de las hojas mojadas durante un día antes de sembrar, ya que disminuye la contaminación por hongos.



Fig. 1. Callos con 2 meses de crecimiento a partir de explantes de hojas almacenadas durante 0 (0d), 1 (1d), 2 (2d) y 3 (3 d) días de almacenamiento antes de aislar los explantes



Fig. 2. Embriones somáticos de café Catimor diferenciados a partir de hojas con 0 días de almacenamiento

El tiempo de almacenamiento de las hojas también afectó la respuesta embriogénica de los explantes, produciendo una mayor cantidad de explantes embriogénicos en baja y alta frecuencia cuando las hojas fueron almacenadas durante un día.

Se recomienda que cuando sea posible, las plantas madres sean tratadas con fungicida un tiempo antes de cosechar las hojas para su siembra *in vitro*.

Se recomienda variar el tratamiento aplicado de los tiempos de almacenamiento, realizando la

desinfección de las hojas con cloro, cuando éstas han sido recién cosechadas y antes de sembrarlas, tal como lo señalan Söndhal et al. (6) en su reporte.

Agradecimientos

Al CDCH-UCV por el financiamiento para realizar la presente investigación (Proyecto de grupo PG-03-7661-2009-2). Al Dr. Hervé Etienne del CIRAD-Francia por el asesoramiento y valiosas discusiones durante la investigación.

Referencias

1. **Cassells, A.C.** (2012). Pathogen and biological contamination management in plant tissue cultura. **Methods Mol. Biol.**, **877**: 57-80.
2. **Ikeda-Iwai, M., Umehara, M., Satoh, S. y Kamada, H.** (2003). Stress-induced somatic embryogenesis in vegetative tissues of *Arabidopsis thaliana*. **Plant J.**, **34**: 107-114.
3. **Lazo-Javalera, M.F., Troncoso-Rojas, R., Tiznado-Hernández, M.E., Martínez-Tellez, M.A., Vargas-Arispuro, I., Islas-Osuna, M.A. y Rivera-Domínguez, M.** (2016). Surface disinfection procedure and *in vitro* regeneration of grapevine (*Vitis vinifera* L.) axillary buds. **Springer Plus**, **5**: 453-462.
4. **Menéndez-Yuffá, A. y García de García, E.** (1997). Morphogenic events during indirect somatic embryogenesis in coffee “Catimor”. **Protoplasma**, **199**: 208-214.
5. **Murashige, T. y Skoog, F.** (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Plant Physiol.**, **15**: 473-497.
6. **Söndhal, R.R., Nakamura, T., Medina-Filho, H.P., Carvalho, A., Fazuoli, L.C. y Costa, W.M.** (1984). Coffee. En: **Handbook of Plant Cell Culture**. Ammirato, P.V., Evans, D.A., Sharp, W.R. y Yamada. Y. (Eds.). Ed. Macmillan Publishing Company y Collier Macmillan Publishers, New York, London: 564-590.
7. **Zavattieri, M.A., Frederico, A.M. y Lima, M.** (2010). Induction of somatic embryogenesis as an example of stress-related plant reactions. **Electronic Journal of Biotechnology**, **13**: 1-9.

Aislamiento e identificación de bacterias patógenas de papa (*Solanum tuberosum* L.).

ANA KARINA MARCANO, GÉNESIS APOLINARIO, YURANI YÉPEZ Y MAIRA OROPEZA

Laboratorio de Mejoramiento Vegetal

*Centro de Botánica Tropical, Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias,
Universidad Central de Venezuela.*

Calle Suapure, Colinas de Bello Monte. Caracas - Venezuela.

Correo: maira.oropeza@ciens.ucv.ve

El Laboratorio de Mejoramiento Vegetal, acompañado por la Corporación para el Desarrollo Científico y Tecnológico (CODECYT), se ha fortalecido como laboratorio de diagnóstico de patógenos bacterianos para asistir a los productores en la certificación de semillas de papa. Además, un sistema de manejo integrado de las enfermedades basado en el diagnóstico de las mismas, es fundamental para el buen rendimiento de los cultivos. En la presente revisión se detallan los resultados obtenidos en el diagnóstico de bacterias patógenas aisladas de tubérculos de papa colectados en El Molino, Estado Mérida y en Chirgua, Estado Carabobo. Para ello, se realizaron análisis morfológicos, bioquímicos y moleculares de las bacterias aisladas. Los resultados mostraron que mediante el uso de estas pruebas fue posible la identificación de cepas de *Pseudomonas* sp. aisladas de tubérculos de papa colectados en El Molino y cepas de *Pectobacterium carotovorum*, *Ralstonia solanacearum* y *Pseudomonas* sp. de los tubérculos colectados en Chirgua. Este diagnóstico permitirá el establecimiento de programas preventivos y manejo integral para aumentar la producción nacional y la certificación de semillas de papa. Se destaca además el uso del cultivo de tejidos vegetales *in vitro* para el establecimiento de las pruebas de patogenicidad y postulados de Koch.

Introducción

Los principales géneros de bacterias fitopatógenas capaces de causar enfermedades en papa son *Erwinia*, *Pectobacterium*, *Dickeya*, *Ralstonia* y *Pseudomonas* (6,18). Muchos de ellos producen síntomas similares, por lo que su diagnóstico basado en las características morfológicas, bioquímicas y moleculares es de suma importancia para el manejo integrado de la enfermedad, para la certificación de semillas y para evaluar la resistencia o susceptibilidad de nuevas variedades a estos patógenos (9,11).

En el Laboratorio de Mejoramiento Vegetal (LMV) del Instituto de Biología Experimental, Universidad Central de Venezuela (IBE-UCV) se ha venido desarrollando una serie de metodologías para el diagnóstico integral de patógenos de cultivos de papa (*Solanum tuberosum* L.), utilizando material vegetal *in vitro* para el análisis de pruebas de patogenicidad y postulados de Koch (1). Una estrategia para evitar la pérdida total o parcial de los cultivos, es el empleo de semillas certificadas a partir del cultivo *in vitro*, garantizando así la producción de plantas libres de patógenos. Por esta razón, el LMV viene trabajando desde el año 2015 con el acompañamiento de la CODECYT para transferir los resultados alcanzados en el diagnóstico de patógenos bacterianos de papa, a los Productores Integrales del Páramo (PROINPA), a fin de que sean incorporados en el proceso de certificación de semilla y se puedan realizar pruebas de patogenicidad a las nuevas variedades liberadas por esta organización de productores. El objetivo de

este trabajo fue la identificación de bacterias patógenas aisladas de tubérculos de papa colectados en El Molino, Estado Mérida y en Chirgua, Estado Carabobo y la realización de pruebas de patogenicidad a las variedades ‘granola’, ‘angostureña’ y ‘nativa’ de papa.

Caso 1. Bacterias aisladas de tubérculos de papa variedad ‘papa de año’, colectados en El Molino, Estado Mérida

Se utilizó un tubérculo de papa variedad ‘papa de año’ colectado en El Molino, Estado Mérida, el cual presentaba síntomas de pudrición. A partir de los tubérculos enfermos se obtuvieron 4 aislados bacterianos (Año 1.1, Año 1.2, Año 2.1 y Año 2.2). Como controles se emplearon cepas de *R. solanacearum* del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), *D. chrysanthemi*, LMV 30 y LMV 31 identificadas por Coppola (4) como *P. carotovorum* y la cepa CVCM 625 (ATCC 10145 *Pseudomonas aeruginosa*) donada por el Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos (IBE-UCV). Se realizó la tinción Gram y se observó la forma, tamaño, color, borde, superficie y levantamiento de las colonias en placas de agar nutritivo. Se realizaron las pruebas de KOH, oxidasa, catalasa, Oxidación-Fermentación, Simmons Citrato, agar de Hierro Kligler, reducción de nitratos, crecimiento en agar cetrinida, SIM (Sulfuro Indol para Movilidad), hidrólisis de la gelatina, arginina deshidrolasa (2,18). La obtención del ADN de los

aislados se realizó mediante los métodos propuestos por (3,10). Se realizó una amplificación del ADN (PCR) con iniciadores universales (12). Adicionalmente, se amplificó la región intergénica espaciadora transcrita (ITS-PCR) según lo descrito por Jensen y col. (11).

Los resultados mostraron que todos los aislados eran bacilos gram-negativos, con forma filamentosa, borde entero, superficie rugosa. Los aislados Año 1.2 y Año 2.1 generan un pigmento de color verde, el aislado Año 1.1 un pigmento verde pardo y el aislado Año 2.2 no presentó pigmentación. Además, generan un olor afrutado. Las especies que integran el género *Pseudomonas*, sintetizan este tipo de pigmentos y generan este olor característico (5,7,20). Todos los aislados fueron capaces de reducir los nitratos a nitritos, móviles, no productores de indol, cuentan con la presencia de la enzima oxidasa y son no fermentadores de carbohidratos; así mismo no producen gas ni ácido sulfhídrico, al igual que la cepa CVCVM 625. El aislado Año 1.1 no fue capaz de utilizar el citrato como única fuente de carbono, al contrario del resto de los aislados que si lo metabolizaron. Además, todos crecieron en agar cetrimida con producción de pigmentos y licuaron la gelatina. Estos resultados concuerdan con lo reportado por (13,18,19,21,22).

Con el método propuesto por Chen y col. (3) se obtuvieron los extractos de ADN de los aislados en estudio.

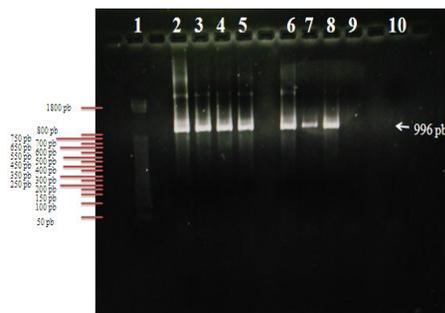


Fig. 1. Electroforesis en gel de agarosa 1,5% de los productos de PCR para la amplificación de la subunidad menor del gen 16S del ADNr. Carril 1: Marcador de peso molecular (50 pb, PROMEGA); Carriles 2-5: aislados Año 1.1, Año 1.2, Año 2.1 y Año 2.2; Carril 6: CVCVM 625; Carril 7: *P. carotovorum*; Carril 8: *R. solanacearum* INIA; Carril 9: *R. solanacearum*; Carril 10: control de reactivos.

En la PCR con iniciadores universales, todos los aislados al igual que los controles amplificaron el fragmento específico de 996 pb (**Fig. 1**). Este resultado implica que todos los organismos en estudio son procariontes (12).

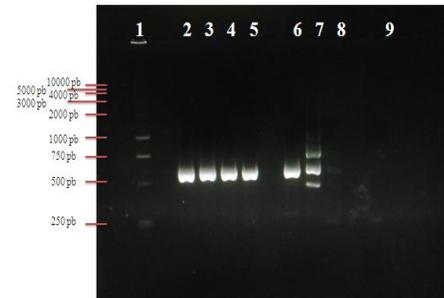


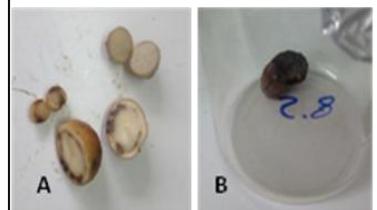
Fig. 2. Electroforesis en gel de agarosa 2% de los productos de PCR para la amplificación de la región espaciadora ITS. Carril 1: Marcador de peso molecular (1 Kb PROMEGA); Carriles 2-5: aislados de Año 1.1, Año 1.2, Año 2.1 y Año 2.2; Carril 6: CVCVM 625; Carril 7: *P. carotovorum*; Carril 8: *R. solanacearum* INIA; Carril 9: control de reactivos.

Al amplificar la región espaciadora intergénica transcrita 16S-23S (ITS), se obtuvo para todos los aislados en estudio y para el control CVCVM 625 el mismo patrón de bandas (**Fig. 2**) mostrando una única banda del mismo tamaño. Este resultado corrobora la similitud de los aislados en estudio con bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas*.

Caso 2. Bacterias aisladas de tubérculos de papa variedad granola, colectados en Chirgua, Estado Carabobo

Las bacterias se aislaron a partir de dos tubérculos de papa colectados en Chirgua, Estado Carabobo con síntomas de enfermedad (**Fig. 3**).

Fig. 3. A) Tubérculo 2.7 con exudado bacteriano en los haces vasculares. B) Tubérculo 2.8 con síntomas de pudrición.



Se obtuvieron 4 aislados bacterianos (2.7.1, 2.7.2, 2.8.1.1 y 2.8.1.2); además se usaron cepas control de *R. solanacearum*, *P. caratovorum* y *D. chrysanthemi*. Se evaluaron las características de forma, tamaño, bordes, superficie, levantamiento y color de las colonias bacterianas y la tinción Gram. Se realizaron las pruebas de agar Hierro Klieger, Simmons Citrato, Oxido-Fermentación (Glu), KOH, Catalasa, Oxidasa, agar P y agar cetrimida.

Tres de los cuatro aislados resultaron bacterias gramnegativas, mientras que el aislado 2.8.1.1 resultó ser grampositivo. Según las características bioquímicas, el aislado 2.8.1.2 se identifica como *P. caratovorum*, siendo catalasa positivo, oxidasa negativo, no fermenta la lactosa, anaeróbico

facultativo. El resto de los aislados no fue capaz de fermentar la glucosa. El aislado 2.7.1 se asemeja a la especie de *R. solanacearum* siendo oxidasa positivo, capaz de metabolizar el citrato y aeróbico. El aislado 2.7.2 es catalasa y oxidasa positivo, citrato negativo y no metaboliza la glucosa por oxidación ni fermentación, sólo creció en Agar P, con una pigmentación azul y no creció en Agar cetrimida, el cual es un medio selectivo para *Pseudomonas aeruginosa*. Por esta razón, se ha identificado preliminarmente como una especie de *Pseudomonas*, pero no *P. aeruginosa*. Se está trabajando en la caracterización molecular de estos aislados para corroborar su identificación definitiva.

Caso 3. Pruebas de patogenicidad

Se estudió el comportamiento de 3 variedades de papa: ‘angostureña’, ‘granola’ y ‘nativa’ ante la infección con las bacterias *R. solanacearum*, *Burkholderia gladioli*, *D. chrisanthemi* y *P. carotovorum*, utilizando rodajas de microtubérculos obtenidos *in vitro*.

Para la producción de microtubérculos, se siguió el protocolo (15,16) (Fig. 4). Para la preparación del inóculo, se tomó una colonia pura de cada aislado bacteriano crecida por 24h en agar LB y se resuspendió en 2 ml de caldo LB. Se incubó por 6 h a 27 °C. Las rodajas de microtubérculos fueron inoculadas según protocolo establecido por (4,8,9). Al finalizar las pruebas se hizo el cálculo de incidencia, severidad y el Índice de Enfermedad (IDE) (14,17).



Fig. 4. Microtubérculos de papa variedad ‘granola’, obtenidos luego de 1 mes de cultivo en medio de tuberización.

En la mayoría de los casos las afecciones aparecieron a partir de las 40 horas post inoculación (hpi) y fueron incrementándose a medida que transcurría el tiempo. *R. solanacearum* produjo pudrición, oxidación y un exudado blanco. Con *D. chrisanthemi* y *P. carotovorum* (Figs. 5 y 6) luego de 66 hpi, se apreció un hundimiento en el centro del tejido. *B. gladioli*, indujo pudrición y hundimiento del tejido que en el transcurso de la experiencia se ennegreció y oxidó (Fig. 7).

Fig. 5. Microtubérculos de la variedad ‘nativa’ inoculados con *D. chrisanthemi*, 10 días después de la inoculación.

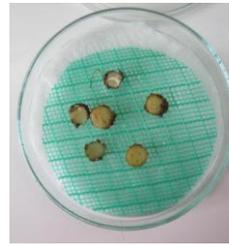
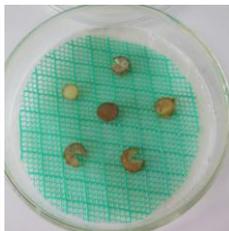
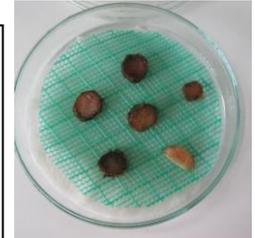


Fig. 6. Microtubérculos de la variedad ‘granola’ inoculados con *P. carotovorum*, 10 días después de la inoculación.

Fig. 7. Microtubérculos de la variedad ‘angostureña’ inoculados con *B. gladioli*, 10 días después de la inoculación.



De los porcentajes de incidencia y de IDE se logró determinar que *R. solanacearum* presenta una sintomatología más severa con respecto al resto de los otros aislados, siendo ‘granola’, la más afectada, seguida por ‘angostureña’ y por último la variedad ‘nativa’, la cual presenta un incremento en el índice de la enfermedad después de 90 hpi (Fig. 8). *B. gladioli* produce un mayor IDE en ‘angostureña’ que en ‘granola’. La ‘nativa’ parece ser menos susceptible a esta enfermedad. En el caso de *D. chrisanthemi*, tenemos que ‘granola’ se ve más afectada, seguida por ‘nativa’ y ‘angostureña’ (Fig. 9). Para *P. carotovorum*, los síntomas en ‘granola’ incrementan después de las 113 hpi. En ‘angostureña’, a las 160 hpi la incidencia y el índice son mayores que incluso para ‘granola’; y la variedad ‘nativa’ presenta menor IDE.

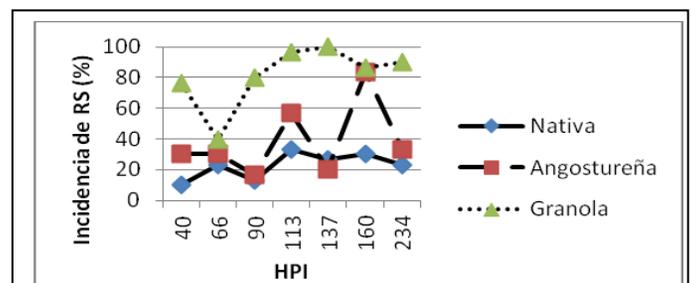


Fig. 8. Incidencia de *Ralstonia solanacearum*.

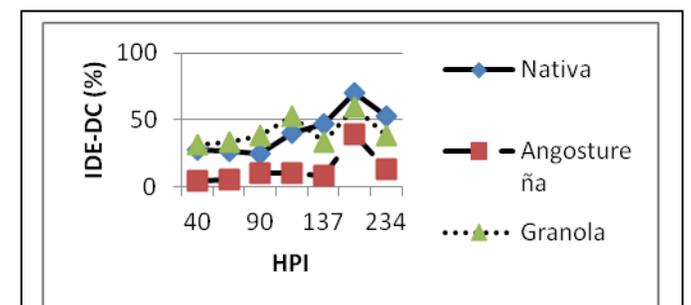


Fig. 9. IDE con *Dickeya chrisanthemi*.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por la CODECYT y por el Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (FONACYT), a través del PROYECTO LOCTI #2013000618.

Referencias

1. **Agrios, G.** (1989). **Fitopatología**. Editorial LIMUSA, México. 741 págs.
2. **Bergey's, W.** (1994). **Manual of determinative bacteriology**. 9ª edición. Lippincott William y Wilkins. Philadelphia. 787 págs.
3. **Chavarro, M., Angel, D. y Martínez H.** (2004). Utilización de iniciadores específicos para el diagnóstico molecular de *Ralstonia solanacearum* a partir de aislamientos provenientes del departamento de Antioquia. **Revista de la División de la Salud, 18:** 67-68.
4. **Coppola, F.** (2015). Caracterización bioquímica y molecular de bacterias aisladas de hojas de papa (*Solanum tuberosum* L.) colectadas en el valle del Río Chama, Estado Mérida, Venezuela. Tesis de Licenciatura. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela, 103 p.
5. **Cox, C.D. y Parker, J.** (1979). Use of 2-aminocetophenone production in the identification of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Clinical Microbiology, 9:** 479-484.
6. **Darrasse, A., Priou, S., Kotoujansky, A. y Bertheau, Y.** (1994). PCR and restriction fragment length polymorphism of a *pel* gene as a tool to identify *Erwinia carotovora* in relation to potato disease. **Applied Environmental Microbiology, 60:** 1437-1443.
7. **El-Fouly, M.Z., Sharaf, A.M., Shahin, A.A.M., El-Bialy, H.A. y Omara, A.M.A.** (2015). Biosynthesis of pyocyanin pigment by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences, 8:** 36-48.
8. **Fernandes, M.** (2016). Identificación de aislados bacterianos patogénicos obtenidos de hojas de papa (*Solanum tuberosum* l.) colectadas en el valle del Río Mucujún, Estado Mérida. Tesis de Licenciatura. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela, 107 p.
9. **Fonseca, I.** (2014). Identificación bioquímica y molecular de *Burkholderia gladioli* y análisis de su interacción con plantas de *Solanum tuberosum*. Tesis Doctoral. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela, 145 p.
10. **Gomes, L., Roncato, M., Andriano, F. y Almeida, F.** (2000). A simple method for DNA isolation from *Xanthomonas* spp. **Scientia Agricola, 57:** 553-555.
11. **Jensen, M., Webster, J. y Straus, N.** (1993). Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction – amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. **American Society for Microbiology, 59:** 945-952.
12. **Lu, J., Perng, C., Lee, S. y Wan, C.** (2000). Use of PCR with universal primers and restriction endonuclease digestions for detection of common bacterial pathogens in cerebrospinal fluid. **Journal of Clinical Microbiology, 38:** 2076–2080.
13. **MacFaddin, J.F.** (2003). **Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica**. Editorial Médica Panamericana, Tercera Edición, España, 850 p.
14. **Montanelli, C., Chiari, A., Chiari, T., Stefanini, F. y Nascari, G.** (1995). Evaluation of resistance to *Pseudomonas solanacearum* in potato under controlled conditions. **Euphytica, 81:** 35-43.
15. **Moreno, M. y Oropeza, M.** (2017). Efecto de las hormonas vegetales y del fotoperiodo en la producción de microtubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L.). **Revista Colombiana de Biotecnología, 19:** 29-38.
16. **Murashige, T. y Skoog, F.** (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Plant Physiology, 15:** 475-597.
17. **Rott, P. y Chagvardieff, P.** (1987). *In vitro* reactions of sugarcane (*Saccharum* sp.) plantlets inoculated with 2 strain of *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson. **Pant Cell, Tissue and Organ Culture, 9:** 9-18.
18. **Schaad, N., Jones, J. y Chun, W.** (2001). **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria**. APS PRESS. Third Edition. Minnesota, USA. 350 págs.
19. **Shivaji, S., Rao, S., Saisree, L., Sheth, V., Reddy, G.S.N. y Bhargava, P.** (1989). Isolation and identification of *Pseudomonas* spp. from Schirmacher Oasis, Antarctica. **Applied and Environmental Microbiology, 55:** 767-770.
20. **Silvestre, J.F. y Betloch, M.I.** (1999). Cutaneous manifestations due to *Pseudomonas* infection. **International Journal of Dermatology, 38:** 419-431.
21. **Sutter, V.** (1968). Identification of *Pseudomonas* species isolated from hospital environment and human sources. **Applied Microbiology, 16:** 1532-1538.
22. **Toth, I., Avrova, A. y Hyman, L.** (2001). Rapid identification and differentiation of the soft rot *Erwinias* by 16S-23S Intergenic Transcribed Spacer-PCR and Restriction Fragment Length Polymorphism analyses. **Applied and Environmental Microbiology, 67:** 4070-4076.

El cultivo *in vitro* como herramienta para la producción de semillas certificadas y establecimiento de bancos de germoplasmas

YAYFRÉ REINA¹, TERESA EDITH VARGAS², LUIS HERMOSO², MICHELLE AMERUOSO², ANTONIO INDRIAGO¹ Y MAIRA OROPEZA¹

¹Laboratorio de Mejoramiento Vegetal, ²Laboratorio de Biotecnología Vegetal
Centro de Botánica Tropical, Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias,
Universidad Central de Venezuela
Calle Suapure, Colinas de Bello Monte. Caracas - Venezuela.
Correo: maira.oropeza@ciens.ucv.ve

La producción de papa, ñame, ajo, fresa, café, batata, ocumo y zanahoria en Venezuela actualmente depende prácticamente de la importación de semillas. Esto ha traído como consecuencia un incremento en los costos de sus productos y de sus semillas. En este trabajo se emplean herramientas de cultivo *in vitro* así como descriptores morfológicos y marcadores moleculares para la caracterización de estos materiales. Acompañados por la Corporación para el Desarrollo Científico y Tecnológico (CODECYT), se logró el escalamiento y la transferencia a campo de estas tecnologías. Se estableció el banco de germoplasma *in vitro* de ñame, caracterizado a nivel morfológico y molecular y se elaboraron cartillas de presentación de cada material incorporado al banco. Se estableció la microtuberización de papa y ñame y la siembra de los microtubérculos en vivero y campo. Se logró la micropropagación de batata, ocumo, fresa, zanahoria y café. Con respecto al ajo, se cultivaron los meristemas apicales obteniéndose bulbificación múltiple. Se logró la aclimatación de vitroplantas de papa, batata, ñame, ajo y fresa.

Introducción

La producción de ajo, ñame, fresa, papa, café, ocumo, batata y zanahoria en Venezuela actualmente depende prácticamente de la importación de semillas, lo que ha ocasionado un incremento en los costos de sus productos y de sus semillas. Desde el año 2015, el Laboratorio de Mejoramiento Vegetal ha venido trabajando acompañado con la CODECYT y los Productores Integrales del Páramo (PROINPA) para la producción de semilla certificada de estos cultivos y para el resguardo de su biodiversidad mediante el establecimiento de bancos de germoplasmas *in vitro* e *in vivo*. En esta revisión se muestran los avances logrados en la micropropagación de ajo, fresa, zanahoria, batata, ocumo y café; se logró la microtuberización de papa y ñame y se estableció y caracterizó el banco de germoplasma de ñame.

Ñame (*Dioscorea* sp.)

El ñame pertenece al género *Dioscorea* de amplia distribución a nivel mundial y el más importante en cuanto a número de especies (4). El conocimiento que se tiene de la organización genética de los materiales disponibles es escaso, lo que impide su uso en programas de mejoramiento (1). El objetivo de este trabajo fue caracterizar a nivel morfológico y molecular seis materiales de ñame (D2, D7, D8, D13, venezolano y colombiano) donados por el Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas

(INIA) y establecer su cultivo *in vitro* para la creación de un banco de germoplasma.

Se aplicaron descriptores morfológicos y se analizó el genoma usando marcadores RAPD (Random Amplified Polimorphic DNA). Se evaluó el efecto de la consistencia física del medio de cultivo MS (6), la concentración de las sales que lo componen y el fotoperiodo. El medio semisólido, con las sales completas y la incubación bajo luz blanca continua, favoreció el crecimiento de las vitroplantas de ñame (**Fig. 1**). El cultivo en medio líquido y la incubación bajo días cortos, favoreció la formación de microtubérculos (**Fig. 2**). Se elaboraron cartillas de presentación de cada clon caracterizado y establecido (**Fig. 3**).



Fig. 1. Vitroplantas de (A) clon D2, (B) clon D7, (C) clon D8, (D) clon colombiano y (E) clon venezolano, de dos meses de edad.



Fig. 2. Microtubérculos de (A) clon D7, (B) clon D2 y (C) clon venezolano.

cultivos; por esto el método propuesto para solucionar este problema es el cultivo *in vitro*. En este trabajo se estableció la micropropagación del ocumo criollo a partir de yemas apicales. Se eliminaron las hojas envolventes dejando al descubierto la yema apical y este explante se desinfectó mediante lavados con agua y jabón, etanol al 70%, cloro 20% y fungicida 6%, concluyendo con 2 lavados con agua destilada estéril. Los explantes se cultivaron en medio MS (6) suplementado con benciladenina (BA) y ANA bajo luz continua a 25°C (5). Se cultivaron 7 yemas de las cuales sobrevivieron 2 (Fig. 8). Actualmente, se están cambiando variables para lograr la propagación masiva de este rubro.

Fig. 8. Vitroplantas de ocumo criollo obtenidas por micropropagación.



Café (*Coffea arabica*)

Los problemas fitosanitarios del cultivo del café causan grandes pérdidas en la producción, razón por la cual el cultivo *in vitro* surge como una buena alternativa para su propagación y para la conservación de su biodiversidad (3).

Se utilizaron plantas de café donadas por productores de Tucaní, Estado Mérida. Las hojas fueron desinfectadas con solución yodada al 10%, cloro comercial al 50% y agua destilada estéril.

Para la iniciación del cultivo, se tomaron secciones de hoja de 1 cm² y se cultivaron en medio MS/2 (6), 1 mg/L de ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4D), 8 mg/L de BA por 12 semanas a temperatura ambiente y en oscuridad. Se obtuvo un tejido de callo de color crema claro con consistencia no friable (Fig. 9).



Fig. 9. Callos embriogénicos de café luego de 12 semanas de cultivo.

Estos callos se subcultivaron en medio MS suplementado con ANA 0,8 mg/l y se incubaron en oscuridad por 8 semanas más, para luego cultivarlos en medio MS (6) sin hormonas vegetales y en condiciones de luz continua. Bajo estas condiciones se desarrollaron las vitroplantas de café (Fig. 10).



Fig. 10. Vitroplanta de café obtenida por embriogénesis somática.

Batata (*Ipomoea batata*)

En Venezuela está planificado el aumento de la producción de batata para el año 2019, por lo que el establecimiento de un sistema de regeneración *in vitro* permitiría la conservación de este rubro y la producción de semilla sana.

Se tomaron brotes de un tubérculo grelado donado por la CODECYT, se lavaron con jabón azul, solución yodada al 40%, fungicida al 20%, cloro al 30% y 3 lavados con agua destilada estéril. Los brotes fueron inoculados en medio MS (6) suplementado con ácido giberélico (GA₃) y ácido indolacético (AIA) y fueron incubados bajo luz continua.

A las 5 semanas de cultivo, se observó un 90% de respuesta con brotes de un tamaño promedio de 6 cm (Fig. 11A). Luego de 2 meses, se observaron raíces y las plantas tenían 12 cm de altura promedio. Luego de 3 meses se cuantificó un promedio de 3 brotes por explante (Fig. 11B). El uso de tierra negra abonada en envases plásticos con tapa de plástico con agujeros, por un tiempo de 15 días, fue una estrategia exitosa para lograr la fase de aclimatación (Fig. 12).

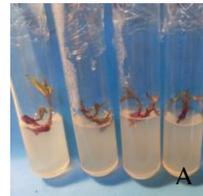


Fig. 11. A) Vitroplantas de batata a las 5 semanas de haber iniciado el cultivo. B) vitroplantas de batata luego de 3 meses de cultivo.



Fig. 12. Planta de batata aclimatada.

Zanahoria (*Daucus carota*)

Los programas de mejoramiento de este cultivo han estado encaminados a lograr variedades que produzcan semillas en nuestras condiciones climáticas y con el cultivo *in vitro* se pueden obtener plantas idénticas conservando las características de una variedad élite (7). En este trabajo se estableció la embriogénesis somática de zanahoria como un método eficiente para su propagación masiva.

Se usaron plantas de zanahoria variedad Flakker colectadas en la Finca Las Tinajas de Eleuteria, Mucuchíes, estado Mérida. Las raíces de las plantas se lavaron con agua y jabón y se cortaron en trozos de 4 cm de largo, sumergiendo estos últimos en una solución de cloro al 20%, seguido por 2 lavados con

agua destilada estéril. Utilizando el sacabocado, se extrajeron cilindros de tejido vascular y se cortaron en discos de 2 mm de grosor. Estos explantes se sembraron en medio MS suplementado con 1 mg/L de 2,4D. Se incubaron 60 explantes en oscuridad durante 7 semanas. Luego, los explantes se colocaron en medio de cultivo MS (6) bajo luz blanca continua. Se obtuvo un índice de multiplicación de 20 vitroplantas por explante. Las vitroplantas (**Fig. 13**) se encuentran en proceso de enraizamiento para su aclimatación en condiciones de vivero.

Fig. 13. Vitroplantas de zanahoria en proceso de enraizamiento para ser llevadas a condiciones de vivero.



Papa (Solanum tuberosum)

La variedad nativa ‘arbolona negra’ se destaca por su resistencia a patógenos, aunque presenta tuberización tardía (8). Para estudiar el efecto de las hormonas vegetales y el fotoperiodo sobre la micropropagación y microtuberización de esta variedad, se cultivaron microesquejes en medio MS (6) líquido con o sin GA₃ y con 25 g/L de sacarosa y se incubaron bajo condiciones de luz blanca constante. Para inducir la microtuberización, las vitroplántulas obtenidas fueron sub-cultivadas en medio MS (6) suplementado con 50 g/L sacarosa, tres concentraciones de BA (0, 1 y 5 mg/L) e incubadas bajo diferentes regímenes lumínicos.

El pre-tratamiento con GA₃ favoreció el alargamiento del vástago (**Fig. 14A**). El cultivo *in vitro* de microesquejes en medios de cultivo suplementados con BA y sacarosa, y la incubación bajo condiciones de días cortos permitió obtener microtubérculos en un tiempo más corto que el que podría esperarse en condiciones tradicionales de cultivo (**Fig. 14B**). Estos microtubérculos, después de cosechados y almacenados en oscuridad por 2 meses, responden a la brotación de yemas con un 96,77% de adaptación en condiciones de vivero (**Fig. 15**).

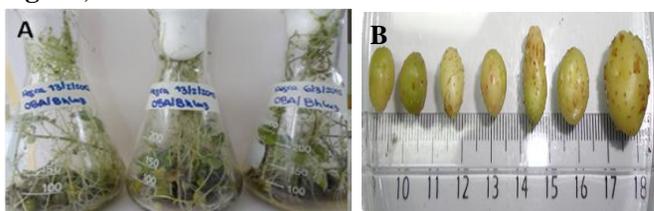


Fig. 14. A) Vitroplantas de ‘arbolona negra’. B) Microtubérculos de ‘arbolona negra’ obtenidos bajo condiciones fotoperiódicas.



Fig. 15. Aclimatación de microtubérculos de la variedad ‘arbolona negra’ de papa.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por la CODECYT y por el Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (FONACYT), a través del PROYECTO LOCTI #2013000618

Referencias

- Aguilar, Z.** (2012). Caracterización morfológica y molecular de la colección de *Dioscorea* spp. del banco de Germoplasma del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Costa Rica. **Tesis de Magister Scientiae en Agricultura Ecológica**, 107 p.
- Ayabe, M. y Sumi, S.** (1998). Establishment of a novel tissue culture method, stem-disc culture, and its practical application to micropropagation of garlic (*Allium sativum* L.). **Plant Cell Reports**, **17**: 773–779.
- García, R. y Ochoa, O.** (2014). Estudio del aprovechamiento sustentable del café (*Coffea arabica*) en Venezuela. **Agrollania**, **12**: 75-79.
- González, M.** (2012). El ñame (*Dioscorea* sp.): características, usos y valor medicinal. Aspectos de importancia en el desarrollo de su cultivo. **Cultivos Tropicales**, **33**: 5-15.
- Matehus, J., Romay, G. y Santana, M.** (2006). Multiplicación *in vitro* de ocumo y taro. **Agronomía Tropical**, **56**: 607-613.
- Murashige, T. y Skoog, F.** (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Plant Physiology**, **15**: 475-597.
- Rodríguez Manzano, A., Capote Rodríguez, A., Benítez, M., Liñeiro, L., Pérez, D., Marrero, N. y Domínguez, A.** (2008). Establecimiento y propagación *in vitro* de zanahoria (*Daucus carota* L.). **Revista Agrotecnia de Cuba**, **5**: 17-24.
- Romero, L. y Monasterio, M.** (2008). Papas negras, papas del páramo. Un pasivo socioambiental de la modernización agrícola en los Andes de Venezuela. **Boletín Antropológico**, **64**: 107-138.
- San Román, M. y Núñez, M.** (2008). Familias virales presentes en cultivos de ajo del estado Mérida. **INIA Hoy**, **2**: 1-6.

Dispersión de semillas de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. (Rutaceae) en un remanente de bosque en los Andes Venezolanos

NELSON RAMÍREZ Y HERBERT BRICEÑO

Laboratorio de Biología Reproductiva de Angiospermas, Centro de Botánica Tropical,
Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. Calle
Suapure, Colinas de Bello Monte. Caracas - Venezuela.
Correo: nramirez220252@gmail.com

La dispersión de semillas de *Zanthoxylum rhoifolium* fue estudiada en un remanente de bosque montano en la ciudad de Mérida, Venezuela. El estudio morfológico de los frutos mostró que tanto el fruto como la semilla representan la unidad de dispersión. Los frutos rojo granate y las semillas negras lustrosas son dispersados por un ensamblaje no especializado de ocho especies pertenecientes a cuatro familias de aves. Todas las especies de aves mostraron un patrón de visita durante las primeras horas de la mañana y últimas de la tarde. La selección de frutos o semillas es discutida con relación al grado de especialización alimentaria de las especies de aves dispersoras.

Introducción

La dispersión de semillas representa una etapa crítica del ciclo reproductivo de las angiospermas. La regeneración exitosa de las especies depende de la dispersión adecuada en la cual un gran número de las semillas producidas alcancen sitios seguros desde el punto de vista competitivo y depredador (5). El modo de dispersión es altamente variable en cuanto al tipo de agentes utilizados para la diseminación de las semillas (15) y depende de muchos factores bióticos y abióticos (3,8), entre los cuales destaca la disponibilidad de animales dispersores (16). De acuerdo a lo anterior, la gran diversidad de animales y plantas en bosques de montaña indican que la dispersión biótica representa un importante mecanismo de diseminación en este tipo de comunidades. De hecho, la endozoocoria ha sido reconocida como el principal modo de dispersión en árboles de bosques montanos (3). En los bosques húmedos de regiones tropicales y subtropicales es precisamente donde son encontradas especies de árboles y arbustos pertenecientes a la familia Rutaceae con su follaje dispuesto en el sub-dosel (6). En estos bosques destaca el género *Zanthoxylum* con un alto número de especies con distribución nativa en ambos hemisferios (6). Las especies neotropicales de *Zanthoxylum* tienen frutos coloridos, dispersados principalmente por aves de bosques húmedos (4, 9,14), aunque también son reportados mamíferos en el bosque Atlántico de Brasil (2) y reptiles en las islas Galápagos (1). Aunque los caracteres morfométricos, colores de los frutos y semillas, así como la ornitocoria en *Zanthoxylum rhoifolium* han sido previamente descritos (4,13), los detalles morfológicos de los frutos, agentes de dispersión y el

grado de especialización alimentaria de las especies dispersoras no han sido detallados para esta especie. Las características morfológicas de los frutos y semillas, coloración y dehiscencia determinan cómo es articulada la relación entre el tipo de diáspora y agentes de dispersión. Por ejemplo, algunas especies de plantas pueden tener diplocoria asociado con diferencias temporales en la coloración de los frutos, características de las semillas y la presencia de dehiscencia tardía (7,8), lo cual puede estar asociado con el uso de diferentes unidades morfológicas y agentes de dispersión. De acuerdo a lo anterior, el presente trabajo describe las características morfológicas de los frutos y semillas de *Zanthoxylum rhoifolium*, exposición de las semillas, así como los potenciales agentes dispersores que consumen los frutos y semillas.

Métodos

Área de estudio. Las observaciones de campo fueron realizadas en un remanente de bosque montano asociado a la quebrada la Gavidia, sector Santa Bárbara, Ciudad de Mérida, Estado Mérida.

Características de los frutos y semillas. El largo y ancho fueron medidos en un total de 20 frutos y semillas maduros. El número de semillas por fruto fue cuantificado en 30 frutos. Posteriormente, fue calculada la relación largo/ancho, la cual puede representar una aproximación de la forma del fruto y semillas. El peso seco de frutos y semillas fue determinado en 30 unidades cada uno a 60°C hasta peso constante. Posteriormente, se determinó la relación pericarpo/semilla: peso fruto menos peso

semillas por fruto dividido por el peso semillas por fruto. La relación pericarpo/semilla es una medida relativa de la inversión materna/progenie (11), además permite inferir sobre la protección que ofrece el pericarpo a las semillas (7,8).

Observaciones de campo. Un árbol de 8 a 10 m de alto fue seleccionado para observar las visitas y comportamiento alimentario de las aves, durante 25 días continuos de noviembre-diciembre (2016-2017), en el cual *Z. rhoifolium* produjo frutos maduros. Las aves fueron observadas en los horarios comprendidos entre 7:00-9:00 y 17:30-19:00, debido a que sólo había actividad durante estos intervalos. Las variables consideradas durante la observación fueron: 1) fenología de maduración de frutos, niveles cualitativos de sincronización del proceso de producción de frutos maduros, y 2) registro de las especies de aves. Las aves fueron identificadas de acuerdo a Phelps y Schauensee (10): nombre común y nombre científico. A continuación, se determinó: 1) número de aves que visitaban simultáneamente el árbol, 2) modo de consumo de frutos y semillas, y 3) el comportamiento de las aves durante la visita, agresivo o no agresivo. Asimismo, el tipo de alimentación reportada para las especies registradas fue también considerada (10). En el segundo año planificado (2017-2018) no fueron realizadas las observaciones porque el árbol no fructificó.

Resultados

Los frutos de *Z. rhoifolium* son producidos en grandes infrutescencias terminales que van madurando sucesivamente desde noviembre a febrero, con un máximo de fructificación entre diciembre y enero, con la mayoría de los frutos rojos granate cerrados (**Fig. 1a**) y sólo pocos frutos abren diariamente, exponiendo una semilla negra lustrosa en el ápice del folículo (**Fig. 1b**).

Los frutos son resinosos con una superficie tuberculada con pequeñas vesículas (**Fig. 1a**).

El tipo morfológico de fruto de *Z. rhoifolium* es un agregado de folículos (cocario), en los cuales sólo un folículo es producido por flor, el cual está frecuentemente acompañado por un segundo folículo abortado. La morfometría de los frutos muestran un largo promedio de 4,57 (DS= 0,20) mm y un ancho de 4,17 (DS= 0,14) mm. Una relación largo/ancho de 1.1 para los frutos de *Z. rhoifolium* confirmó una forma circular. De manera similar, las semillas tienen un largo de 3,09 (DS= 0,15) mm y un ancho de 2,90 (DS= 0,14) mm con una relación largo/ancho que evidencia una forma circular (1,07). Cada folículo

produce una sola semilla ($\xi = 1,0$; DS= 0,0) y tiene un peso de 26,9 mg y la semilla pesa 12,1 mg. La relación pericarpo/semilla de 1,2 indica una asignación de biomasa materna (pericarpo) ligeramente mayor que la biomasa de la semilla (progenie).

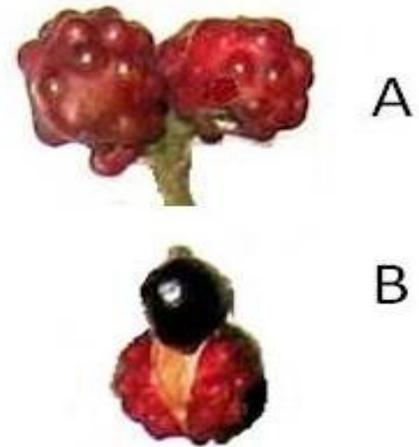


Fig. 1. Frutos (A) y fruto con semilla expuesta (B) de *Z. rhoifolium*.

Consumidores de semillas. Un total de ocho especies pertenecientes a cuatro familias de aves fueron observadas consumiendo frutos y semillas de *Z. rhoifolium* (**Tabla 1**). La mayoría de las especies fueron observadas todos los días. A excepción de azulejos y paraulatas, las visitas fueron mayoritariamente realizadas por aves solitarias. El comportamiento interespecífico mostró que las especies de la familia Traupidae toleraba la presencia de otras especies de aves, mientras que las otras especies de aves mostraron un comportamiento agresivo (**Tabla 1**).

La forma de aproximación y el consumo de los frutos y semillas observado consistió en la llegada de las aves directamente a las ramas internas del árbol, posteriormente las aves se dirigían a las infrutescencias terminales. La permanencia de las aves en el árbol fue menor de cinco minutos; los grupos de paraulatas llaneras permanecían mayor tiempo en el árbol. Las aves visitaban de dos a cinco infrutescencias donde sólo consumían uno o dos frutos o semillas, luego abandonaban el árbol. No se determinó en todos los casos si las aves consumían frutos completos o las semillas expuestas, pero de acuerdo a los movimientos de las aves sobre las infrutescencias es presumible que la mayoría de las especies consumían frutos y semillas. Sin embargo, parecen existir algunas preferencias: las paraulatas llaneras y azulejos consumían los frutos completos,

así como las otras especies de Traupides, mientras que los Tyrannidae parecían consumir las semillas.

Tabla 1. Especies de aves observadas consumiendo frutos y semillas de *Z. rhoifolium* y comportamiento durante la visita.

Familia Especie	Nombre común ¹	Número de aves por visitas	Comportamiento Observado	Tipo de alimentación reportada ¹
Cotingidae				
<i>Pachyromphus cinnamomeus</i>	Cabezón canelo	Solitario	Agresivo	Semillas e insectos
Traupidae				
<i>Rhamphocelus dimidiatus</i>	Sangre de toro encendido	Solitario	No agresivo	Frutos e insectos
<i>Rhodinocichla rosea</i>	Frutero paraulata	Solitario	No agresivo	Frutos e insectos
<i>Thrampus episcopus</i>	Azulejo	En parejas	No Agresivo	Frutos e insectos
<i>Thrampus palmerum</i>	Azulejo de palmeras	En parejas	No Agresivo	Frutos e insectos
Minidae				
<i>Mimus gilvus</i>	Paraulata llanera	De 4-6	Agresivo	Frutos e insectos
Tyrannidae				
<i>Myiozetetes similis</i>	Pitirre copete rojo	Solitario	Agresivo	Semillas e insectos
<i>Tyrannus dominicensis</i>	Pitirre gris	Solitario	Agresivo	Frutos, semillas e insectos

¹ Información de Phelps & Schauensee (10)

Discusión

La fructificación en *Z. rhoifolium* consiste de un período relativamente largo durante la transición lluvia-sequía. La reproducción no es un proceso de recurrencia periódica anual, lo cual sugiere períodos interanuales de reproducción. La ausencia de fructificación durante un año de estudio permitió observar algunas de las aves registradas en *Z. rhoifolium* consumiendo frutos de otras especies con frutos de coloración y tamaño similares.

Los registros de aves consumidoras de frutos y semillas confirman la dispersión de semillas por aves en *Z. rhoifolium*, tal como había sido reportada previamente (4,13). Algunas características generales de los frutos corroboran el carácter ornitocórico de *Z. rhoifolium*. En primer lugar, las grandes infrutescencias con muchos frutos de color rojo granate, representan un atrayente a larga distancia. En segundo lugar, los frutos rojos, así como las semillas negras lustrosas que contrastan con los frutos rojos, tienen forma y tamaño apropiados para ser consumidos por las aves observadas. De hecho, las aves observadas tienen un tamaño corporal y tamaño de la base del pico que permite el consumo de los frutos y semillas de *Z. rhoifolium*.

La presencia de características de coloración y exposición de frutos y semillas a diferentes tiempos del período de fructificación ha sido relacionada con diferentes modos de dispersión (7,8). La unidad de dispersión en *Z. rhoifolium* está representada por el fruto y la semilla, ambos con capacidad para la dispersión. Esta particularidad puede incrementar la efectividad de la dispersión al incluir un grupo variado de especies de aves con preferencias contrastantes en el consumo de los frutos y/o semillas. Por otra parte, los frutos de *Zanthoxylum* consumidos por aves tienen pequeñas semillas

ariladas (14), lo cual contrasta con las semillas negras lustrosas sin arilo en *Z. rhoifolium*.

La variedad de aves registradas consumiendo frutos y semillas de *Z. rhoifolium* en cuanto a sus preferencias alimentarias sugiere que la dispersión de semillas es realizada por aves no especializadas, lo cual concuerda con lo señalado para el consumo de frutos en el género *Zanthoxylum* (14) y en *Z. rhoifolium* (13). De acuerdo a lo anterior, cuatro hipótesis alternativas son propuestas para explicar cómo puede ocurrir el proceso de atracción, consumo y subsecuente dispersión de frutos y semillas en *Z. rhoifolium*: 1) Atracción por aves con preferencias alimentarias frugívoras por la coloración roja granate del fruto y el tamaño adecuado como son las especies de Traupidae, éstas también pueden ser atraídas y consumir las semillas negras lustrosas expuestas que contrastan con la coloración de los frutos. 2) Aves con preferencias alimentarias insectívoras como *Mimus gilvus*, consumen también frutos de otras especies similares a *Z. rhoifolium*. Además, podrían ser atraídas a los frutos por la superficie tuberculada que aparenta infección por larvas. Algunos vertebrados frugívoros pueden seleccionar activamente frutos y semillas que contienen insectos (12). Aves como los Tyrannidae con hábitos alimentarios preferentemente insectívoros (10) pueden ser atraídas por las semillas negras lustrosas que mimetizan pequeños insectos sobre los frutos.

Finalmente, el consumo y dispersión de los frutos como unidad de dispersión en *Z. rhoifolium* está asociada con dos atributos de protección de las semillas. Una relación pericarpo/semilla ligeramente superior a uno sugiere la protección de la semilla (7), lo cual es particularmente importante en *Z. rhoifolium* donde una sola semilla es transportada por agentes no especializados. La resina de los frutos también puede proteger a la semilla, ya que podría estimular la regurgitación. Además, la dispersión podría ser

maximizada por la corta duración de las visitas promovida por la acción repelente de la resina y por las relaciones de agresividad entre especies.

En conclusión, la unidad de dispersión de *Z. rhoifolium* está representada por los frutos y las semillas, las cuales son dispersadas por un ensamblaje no especializado de ocho especies de aves, con diferentes niveles de afinidad al consumo de frutos y semillas.

Referencias

1. **Blake, S., Wikelski, M., Cabrera, F., Guezou, A., Silva, E., Sadeghayobi, Yackulic, C.B. y Jaramillo, P.** (2012). Seed dispersal by Galápagos tortoises. **J. Biog.**, **39**: 1961–1972.
2. **Bufalo, F.S., Galetti, M. y Culot, L.** (2016). Seed dispersal by primates and implications for conservation of a biodiversity hotspot, the Atlantic forest of South America. **Inter. J. Primatology** doi: 1007/s10764-016-9903-3.
3. **Buitrón-Jurado, G. y Ramírez, N.** (2014). Dispersal spectra, diaspore size and the importance of endozoochory in the equatorial Andean montane forest. **Flora**, **209**: 299-311.
4. **Galetti, M., Pizo, M.A. y Morellato, L.P.C.** (2011). Diversity of functional traits of fleshy fruits in a species-rich Atlantic rain forest. **Biota Neotropica**, **11**(1): <http://www.biotaneotropica.org.br/v11n1/en/abstract?article+bn02811012011>.
5. **Janzen, D.H.** (1970). Herbivores and the number of tree species in tropical forest. **Amer. Nat.**, **104**: 501-528.
6. **Kallunki, J.** (2004). Rutaceae. in: **Flowering plants of the neotropics**. 333-335 p. N. Smith, S. A. Mori, A. Henderson, D. Wm. Stevenson & S. V. Heald. (eds.). Princeton University Press, Princeton, New Jersey.
7. **López, M. y Ramírez, N.** (1989). Características morfológicas de frutos y semillas y su relación con los síndromes de dispersión de una comunidad arbustiva en la Guayana venezolana. **Acta Cient. Venezolana**, **40**: 354-371.
8. **López, M. y Ramírez, N.** (1998). Síndromes de dispersión de diásporas de una comunidad arbustiva de la Guayana venezolana. **Ecotropicos**, **11**: 15-32.
9. **Martins, V.F., Cazotto, L.P.D. y Santos, F.A.M.** (2014). Dispersal spectrum of four forest types along an altitudinal range of Brazilian Atlantic rainforest. **Biota Neotropica**, **14**(1) e20130003.
10. **Phelps, Jr., W.H. y de Schauensee, R.M.** (1978). Aves de Venezuela. Princeton University Press, Princeton, Nueva Jersey, USA.
11. **Ramírez, N. y Berry, B.** (1993). Producción y costo de frutos y semillas relacionados a los tipos morfológicos de frutos, unidad de dispersión y síndrome de dispersión. **Ecotropicos**, **6**: 43-61.
12. **Sallabank R. y Courtney, S.P.** (1992). Frugivory, seed predator, and insect-vertebrate interactions. **Annu. Rev. Entomol.**, **37**: 377-400.
13. **Silva, I.A., de Figueiredo, R.A. y da Silva Matos, D.A.** (2008). Feeding visit time of fruit-eating birds in cerrado plants: revisiting the predation risk model. **Rev. Brasi. Zool.**, **25**: 682-688.
14. **Snow, D.W.** (1981). Tropical frugivorous birds and their food plants: a world survey. **Biotropica**, **13**: 1-14.
15. **van der Pijl, L.** (1972). **Principles of dispersal in higher plants**. Second Edition. Springer-Verlag, Berlin.
16. **Wandrag, E.M., Dunham, A.E., Miller, R.H. y Rogers, H.S.** (2015). Vertebrate seed dispersers maintain the composition of tropical forest seed banks. **AoB Plants**, **7**: plv130; doi:10.1093/aobpla/plv130.

Una visión comparativa entre la agricultura de altos insumos y bajos insumos y su efecto sobre los Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA) y algunos parámetros bioquímicos y microbiológicos del suelo

ALICIA CÁCERES¹, MAOLY MÁRQUEZ¹, FRANK ZARRAGA¹,
ISMAEL HERNÁNDEZ², KARLA CÁCERES-MAGO¹ Y DAVID SIERRAALTA¹

¹Laboratorio de Nutrición Mineral de Plantas Silvestres; Centro de Botánica Tropical
Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela
Apartado 47114. Caracas 1041A, Venezuela. Correo: alicia2001@gmail.com

²Laboratorio de Ecología de Agroecosistemas, Instituto de Zoología y Ecología Tropical, Centro de Ecología Aplicada, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela

La aparición de nuevas estrategias de desarrollo agrícola para asegurar una producción estable de alimentos que sean acordes con la calidad ambiental, ha traído como consecuencia cambios en los paradigmas del uso de la tierra, disminuyendo la aplicación de agroquímicos y evaluando alternativas que permitan mejorar el equilibrio biológico y la fertilidad del suelo. De esta manera, se busca restaurar agroecosistemas a través del desarrollo de alternativas tecnológicas basadas en recursos locales (biológicos y naturales), que permitan la producción de bioinsumos, para así generar sistemas menos perturbados con una agricultura sustentable. Una de las posibilidades es explorar las reservas microbiológicas nativas benéficas, ya que ofrecen un potencial para desarrollar tecnología alternativa para los agricultores. El uso de biofertilizantes formados por consorcios de microorganismos benéficos como los hongos micorrízicos arbusculares (HMA), uso de compost y otras alternativas menos dañinas con el ambiente, no sólo han dado excelentes resultados en el incremento de la producción de las especies agrícolas, sino en la restauración de la calidad de los suelos.

Introducción

La aparición de nuevas estrategias de desarrollo agrícola para asegurar una producción estable de alimentos que sean acordes con la calidad ambiental, ha traído como consecuencia cambios en los paradigmas del uso de la tierra, disminuyendo el uso de agroquímicos y evaluando alternativas que permitan mejorar el equilibrio biológico y la fertilidad del suelo (1). La sostenibilidad agrícola ha cobrado especial interés en los últimos años, ya que este tipo de manejo de los agroecosistemas repercute en beneficios para el hombre, así como para el balance ecológico y agroecológico. Sin embargo, para fortalecer los sistemas agrícolas sostenibles se requiere del conocimiento fundamental de los diversos componentes que lo integran y que pueden ser determinantes en la funcionalidad de los mismos (15,16). Bajo este contexto, gran parte de la productividad de los cultivos está determinada por la fertilidad del suelo, siendo una de las prioridades explorar las reservas microbiológicas nativas benéficas ya que ofrecen un potencial para desarrollar tecnología alternativa para los agricultores (3,4,16).

Es reconocido que la gran mayoría de las plantas captan los nutrientes por medio de interacciones que establecen con los microorganismos que viven en la

rizósfera, especialmente con aquéllos que se han denominado simbioses. De allí, que actualmente los microorganismos jueguen un papel importante en la sustentabilidad de los ecosistemas (1,3). Entre los microorganismos que habitan en los suelos y que tienen funciones importantes en el ciclaje de nutrientes, están los hongos micorrízicos arbusculares (HMA), que constituyen asociaciones mutualistas entre los hongos del *Phylum* Glomeromycota y las raíces de la mayoría de las plantas (2,3,5). Esta simbiosis ha incrementado su interés, como insumo microbiológico en la agricultura sustentable, pues facilita la captación de fósforo, un nutriente limitante en la mayoría de los suelos tropicales, además de proporcionar otros beneficios para las plantas como la tolerancia a situaciones de estrés, estabilidad de los agregados del suelo, entre otros (4).

Otra simbiosis relevante, pero menos estudiada, es la que ocurre en las raíces de las plantas con los hongos septados oscuros (HSO), los cuales son Ascomycetes, anamórficos y dematiáceos que colonizan intra e intercelularmente los tejidos de las raíces; su presencia en diversos ambientes colonizando un vasto número de especies, podría llevar a considerar que tienen un papel similar a los

HMA, en cuanto a la disponibilidad de nutrientes (1,12).

Ante la nueva concepción en el uso de la tierra, se ha implementado el uso de insumos biológicos, el cual no debe verse como una sustitución de insumos por sí mismos, ya que si no se cuestiona la estructura de monocultivos y la dependencia de insumos externos (agroquímicos entre otros) no se ofrecerán alternativas factibles que permitan revertir la degradación acelerada de los recursos naturales para la producción de alimentos a futuro (2,16).

La calidad del suelo, desde el punto de vista de las interacciones de las propiedades físicas, químicas y biológicas, produce cambios significativos en los ciclos biogeoquímicos del suelo y en la disponibilidad de nutrientes a las plantas (5,7). De estas interacciones, se deriva la importancia de evaluar el efecto del manejo de monocultivos y uso excesivo de agroquímicos induciéndose cambios en todos los indicadores de calidad del suelo, que en muchos casos, podrían no ser recuperables.

La presente revisión intenta resaltar la importancia del manejo de sistemas agrícolas en el área de Mucuchíes y el Páramo de Gavidia (Mérida) y su efecto sobre la actividad microbiológica del suelo como elemento importante en la regulación e incorporación de los nutrientes en la producción de papa, ajo y zanahoria en áreas de alta montaña.

Resultados y discusión

Indicadores biológicos de calidad de suelo en cultivos comerciales y cultivos tradicionales de bajos insumos

El manejo intensivo y el uso de agroquímicos en sistemas de producción como la papa (*Solanum tuberosum* spp. *tuberosum*) en la alta montaña en Venezuela, ha traído como consecuencia que en las últimas décadas se hayan tratado de realizar cambios importantes hacia una agricultura sustentable orientada al rescate de la papa nativa (*Solanum tuberosum* ssp. *andigenum*) original de los pueblos andinos y a un manejo menos negativo con el ambiente. Sin embargo, persiste la producción de otros rubros (ajo y zanahoria) que generan mayores ingresos económicos pero que van en detrimento del ecosistema páramo por los altos requerimientos de agroquímicos.

En la **Tabla 1** se muestran los resultados de algunos indicadores biológicos de diferentes tipos de manejo agrícola: 1) Cultivos de papas nativas y papas comerciales respecto a un páramo considerado como ecosistema de referencia, y 2) Cultivos de ajo y zanahoria en comparación a una parcela con manejo agroecológico.

Tabla 1. Indicadores biológicos/bioquímicos en las diferentes localidades. Valores medios \pm ES. **A.Des:** Actividad de la deshidrogenasa. **A.Fac:** Actividad de la fosfatasa ácida. **PR:** Suelo del páramo de referencia. **PN:** Papa nativa. **PC:** Papa comercial. **AJ:** Ajo. **ZN:** Zanahoria. **PA:** Parcela agroecológica. Letras diferentes señalan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Situación	Respiración B (mgC-CO ₂ .kg ⁻¹ .d ⁻¹)	Carbono M (mgC. Kg ⁻¹ .h ⁻¹)	A.Des (μmoles TPF.g ⁻¹ .d ⁻¹)	A.Fac (μmoles p-NF.g ⁻¹ .h ⁻¹)
Papa nativa y papa comercial				
PR	39,5± 5,0 a	933,8± 60,9 c	0,03± 0,01 g	19,3± 4,1 j
PN	30,9± 9,2 a	557,8± 78,6 d	0,01± 0,002 h	13,1± 6,1 jk
PC	7,3± 3,1 b	520,2± 36,7 d	0,004± 0,001 i	8,9± 1,9 k
Ajo y zanahoria				
AJ	48,70± 4,36 l	988,80± 43,25 n	0,0030± 0,0004 p	0,32± 0,10 r
ZN	49,70± 6,70 l	698,91± 96,76 ñ	0,0034± 0,0002 p	0,26± 0,04 r
PA	168,49± 23,7 m	322,83± 30,41 o	0,0045± 0,0004 q	1,82± 0,16 s

Se observa que la respiración basal es mayor en el páramo y en el suelo post cosecha de papas nativas, quintuplicando aproximadamente el valor reflejado por el suelo con papas comerciales, tendencia similar se detalla entre el suelo de ajo y zanahoria con la parcela agroecológica; que indica que hay actividad metabólica de los microorganismos en PA y PR. El carbono microbiano como estimación de la biomasa microbiana es mayor en el páramo, dicho indicador se ve afectado por la cubierta vegetal, la cual se acumula en el páramo, mientras que en los cultivos no hay cubierta vegetal lo que conlleva a una disminución de la biomasa microbiana, por pérdida de biodiversidad.

En cuanto a las localidades de ajo y zanahoria, se observó que AJ presentó un mayor valor de carbono microbiano, en comparación con el resto de las localidades que puede estar asociado a la incorporación constante de agroquímicos que alteran la comunidad microbiana presente y el uso de C en el mantenimiento de las comunidades (9).

Otros indicadores biológicos/bioquímicos usados fueron la determinación de actividad enzimática, relacionada con otros parámetros de la calidad del suelo como el contenido de materia orgánica, la biomasa y actividad microbiana y la disponibilidad de nutrientes, entre otras. La actividad enzimática

puede reflejar cambios más rápidos respecto a otras propiedades del suelo.

La actividad de la deshidrogenasa disminuye en más de 60% en cultivos de papas, siendo menor en PC en comparación al páramo de referencia; así mismo, se detalla como en PA este indicador es mayor respecto a los manejos intensivos de ajo y zanahoria. Estas respuestas expresan que hay un continuo proceso de oxidación-reducción de la materia orgánica en estas localidades, en el páramo y en PA. La fertilización química afecta la actividad de la deshidrogenasa debido a modificaciones en la comunidad microbiana, además los microorganismos agotan de manera más rápida la fuente de carbono fácilmente degradable, por lo que disminuye la producción de esta enzima de acción intracelular (10). La actividad de la fosfatasa ácida, por su parte, es menor en las parcelas en donde hay incorporación de P como fertilizante químico o enmiendas orgánicas, ya que el P actúa como un retro alimentador negativo.

Se puede deducir, a partir de estos resultados, que el cultivo de papas, ajo y zanahoria, así como las especies de la PA, producen cambios en las propiedades biológicas del suelo, siendo menos marcados en la parcela de papas nativas y en PA, lo que podría indicar el nivel de conservación de los suelos cuando se disminuye el uso de agroquímicos.

Micotrofia del sistema en cultivos comerciales y cultivos tradicionales de bajos insumos

La micotrofia de las localidades estudiadas (**Tabla 2**) es alta (>50%), entendiéndose por micotrofia la capacidad de las plantas de asociarse a los HMA. Los resultados indican que los diferentes tipos de manejo dado en la producción de papas no afectan la colonización por parte de las HMA, pero en ajo y zanahoria sí se ve afectada. Se puede inferir que la micotrofia en estos sistemas está asociada a la alta micotrofia de los cultivos (8,10), que podría estimular el crecimiento del hongo o recuperación del inóculo natural, como ha sido señalado en cultivos como la yuca y el maíz en agricultura de subsistencia (Amazonas), donde después de la tala y quema el establecimiento de conucos incrementa la producción de propágulos (6,7,11).

En torno a los resultados de las esporas como estructuras de propagación de los HMA, éstos indican que la densidad de las mismas es menor en suelos con manejos comerciales. La disminución del número de esporas se atribuye al constante manejo agronómico que se le da al suelo. Se debe tener en cuenta que la micotrofia del sistema no es un carácter definitivo, ya que sólo proporciona información de la presencia o ausencia mas no la funcionalidad de la simbiosis.

Respecto a la colonización de HSO, se detalla que es menor en comparación a la colonización por HMA y dichos valores difieren en las localidades, siendo mayor en PC y PA. La baja disponibilidad de P (deducida por la actividad de la fosfatasa ácida), como la ineficiencia de los cultivos de papa comercial en la adquisición del P del suelo (13,14), inciden en que las plantas presenten diferentes adaptaciones simbióticas (HMA y HSO) que mejoran la toma del mismo.

En Venezuela, se había reportado la presencia de HSO solo en zonas de condiciones extremas relacionadas a la alta concentración de elementos tóxicos para las plantas; como ocurre en el ecotono y la sabana de Loma de Níquel, lo que sugiere que la asociación se ve favorecida bajo condiciones estresantes independientemente de haya colonización por HMA (1).

Tabla 2. Estatus micorrízico en las diferentes localidades. Valores medios \pm ES. **PMA:** Colonización HMA. **HSO:** Colonización de HSO. **D.E:** Densidad de esporas. **PR:** Suelo del páramo de referencia. **PN:** Papa nativa. **PC:** Papa comercial. **AJ:** Ajo. **ZN:** Zanahoria. **PA:** Parcela agroecológica Letras diferentes señalan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Localidad	PMA (%)	HSO (%)	D.E
PR	61,5 \pm 1,0 a	11,4 \pm 2,0 b	580 \pm 155 d
PN	66,4 \pm 3,0 a	4,0 \pm 1,1 b	481 \pm 71 d
PC	66,1 \pm 2,4 a	20,1 \pm 3,2 c	233 \pm 14 e
AJ	66,0 \pm 4,6 f	1,5 \pm 0,2 h	145 \pm 22 k
ZN	57,0 \pm 3,8 f	3,5 \pm 0,9 i	95 \pm 17 k
PA	80,0 \pm 2,9 g	15,8 \pm 1,8 j	340 \pm 26 l

Conclusiones

La presencia de HMA en los diferentes tipos de manejo agrícola de altos y bajos insumos, indica que los cultivos podrían tener un efecto sobre el crecimiento y actividad de estos hongos, sin embargo faltaría por evaluar la eficiencia de los HMA en el establecimiento funcional de la simbiosis. La presencia de HSO fue mayor en las localidades en donde la incorporación de fósforo era más demandante, ya sea por las características del cultivo o por las condiciones químicas de la localidad. En el cultivo de papas nativas y la parcela agroecológica, los indicadores de calidad del suelo mostraron cambios menos marcados en la calidad biológica de suelo en comparación a las

parcelas de altos insumos químicos. Estos resultados son un aporte más a las evidencias hasta ahora presentadas sobre el deterioro de los suelos en sistemas agrícolas de altos insumos. Se requiere establecer cambios importantes en la agricultura moderna que permitan la preservación de los suelos y el ambiente de manera de mantener una agricultura sustentable para el uso de las generaciones futuras.

Agradecimientos

A las comunidades organizadas de Mucuchíes y del Páramo de Gavidia. Al CODECYT ente financiador de este proyecto.

Referencias

1. Aguirre, I. (2012). **Estudio de los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) y los hongos septados oscuros (HSO), y su relación con el suelo, en dos litologías diferentes en la localidad de Loma de Hierro, estado Aragua.** Tesis de Licenciatura. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
2. Altieri, M.A. y Nicholls, C.I. (2000). **Agroecología: Teoría y práctica para una agricultura sustentable.** PNUMA. Primera edición. Ciudad de México, México.
3. Altieri, M.A. y Nicholls, C.I. (2007). Conversión agroecológica de sistemas convencionales de producción: teoría, estrategias y evaluación. **Revista Ecosistemas**, 16(1): 3-12.
4. Astier, M., Maass, M. y Etchevers, J. (2002). Derivación de indicadores de calidad de suelos en el contexto de la agricultura sustentable. **Agrociencia**, 36: 605-620.
5. Barea, J., Azcón, R. y Azcón-Aguilar, C. (2005). Interactions between mycorrhizal fungi and bacteria to improve plant nutrient cycling and soil structure. En: F. Buscot, A. Varma (Eds.). **Microorganism in soils: Roles in genesis and functions.** Springer. Berlín, Alemania.
6. Barrow J. y Osuna P. (2002). Phosphorus solubilization and uptake by dark septate fungi in four wing saltbrush, *Atriplex canescens* (Pursh) Nutt. **J. Arid Environ.**, 51: 449-459.
7. Cáceres, A y Cuenca, G. (2006). Contrasting responses of seedlings of two tropical species *Clusia minor* and *Clusia multiflora* to mycorrhizal inoculation in two soils with different pH. **Tree Structure and Function**, 20(3): 593-600.
8. Cáceres, A. y Kalinhoff, C. (2003). **Efecto de la perturbación producida por el establecimiento del conuco sobre las micorrizas arbusculares (MA).** Informe Técnico FONACIT ULA-UCV.
9. Cuenca, G., Cáceres, A., Oidobro, G., Hasmy, Z. y Urdaneta, C. (2007). Las micorrizas arbusculares como alternativa para una agricultura sustentable en áreas tropicales. **Interciencia**, 22(1): 23-29.
10. Dick, R. (1997). Soil enzyme activities as integrative indicators of soil health. En: C. Pankhurst, B. Double, V. Gupta. **CABI.** Primera edición. Wellingford, Reino Unido.
11. Järvan, M., Edesi, L., Alamson, A. y Võsa, A. (2014). Soil microbial communities and dehydrogenase activity depending on farming systems. **Plant. Soil. Environ.**, 60: 459-463.
12. Kalinhoff, C., Cáceres, A. y Lugo, L. (2009). Cambios en la biomasa de raíces y micorrizas arbusculares en cultivos itinerantes del Amazonas venezolano. **Interciencia**, 34(8): 571-576.
13. Mandyam K. y Jumpponen A. (2005). Abundance and possible functions of the root-colonizing dark septate endophytic fungi. **Stud. Mycol.**, 53: 173-189.
14. McArthur, D. y Knowles, R. (1993). Influence of species of vesicular-arbuscular mycorrhizal phosphorus nutrition on growth, development and mineral nutrition of potato (*Solanum tuberosum*). **Plant. Physiol.**, 102(3): 771-782.
15. Moreno, P. (1988). Inoculación de micorrizas MVA en papa (*Solanum tuberosum*). Respuesta en el crecimiento y nutrición de plantas inoculadas en invernadero y en campo. **Rev. ALAP.**, 1(1): 84-103.
16. Rosset, P. (1998). **La crisis de la agricultura convencional, la sustitución de insumos y el enfoque agroecológico.** Policy Brief N° 3. Food First. Institute for Food and Development Policy. Oakland, 15 p.

El arbusto *Hypericum laricifolium* Juss como ingeniero ecosistémico en un gradiente altitudinal en el páramo desértico: variaciones microambientales y asociaciones espaciales con otras especies de la comunidad

KARLA CÁCERES-MAGO¹, ALICIA CÁCERES¹ Y LUIS DANIEL LLAMBÍ²

¹Laboratorio de Nutrición Mineral de Plantas Silvestres; Centro de Botánica Tropical
Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela
Apartado 47114. Caracas 1041A, Venezuela. Correo: kcaceresmago@gmail.com

²Instituto de Ciencias Ambientales y Ecológicas, Universidad de Los Andes

Los ecosistemas de alta montaña tropical se han caracterizado como una zona de rigurosidad climática y además presentan variaciones de estrés abruptas a lo largo de los gradientes altitudinales, por lo que han sido ampliamente estudiados con el fin de comprender los patrones y mecanismos de las interacciones planta-planta. En el páramo desértico de los Andes Venezolanos se han encontrado importantes evidencias sobre el papel del arbusto *Hypericum laricifolium* como ingeniero ecosistémico (IE), lo que nos ha llevado a estudiar su efecto sobre las variaciones microambientales y sus asociaciones espaciales con otras especies de la comunidad a lo largo de un gradiente altitudinal del páramo desértico, encontrando importantes cambios microambientales debido a la presencia de su copa, con respecto a las áreas abiertas. Además, se determinó la riqueza y diversidad de especies que crecen bajo la influencia del arbusto y en los espacios abiertos y los resultados mostraron que ambos parámetros fueron significativamente mayores en las áreas bajo *H. laricifolium*. Entonces, si esta especie arbustiva actúa como IE, su conservación en la alta montaña debe ser una preocupación central para el mantenimiento de la diversidad para estos hábitats particularmente estresados.

Introducción

El establecimiento de plantas en la alta montaña se encuentra limitado por diferentes factores que caracterizan estos ecosistemas, tales como las temperaturas extremas del aire y del suelo, la inestabilidad del sustrato y la elevada evapotranspiración generada por el viento y la alta radiación solar (17) y este conjunto de condiciones ambientales produce una serie de limitaciones en el proceso reproductivo de las plantas (15).

Connell y Slatyer (12) han planteado que en los ambientes de clima frío, el proceso sucesional se asemejaría al modelo de facilitación. Según este modelo, existiría un grupo de especies pioneras capaces de colonizar un sitio con condiciones físicas extremas que permiten el establecimiento de otras especies. La presencia de estas especies pioneras genera nuevas condiciones microclimáticas o edáficas que facilitan el establecimiento de otras especies sucesionalmente más tardías (19). En los ecosistemas de alta montaña, estas especies pioneras suelen identificarse como especies fundacionales o ingenieros ecosistémicos (IE), debido a su capacidad de controlar directa o indirectamente los recursos disponibles, generando cambios tanto en las condiciones bióticas como abióticas, siendo capaces de crear, mantener o destruir el hábitat de otras especies, modulando el ambiente (2).

Se ha propuesto que la atenuación de las condiciones estresantes por parte de las especies que actúan como IE, generando microambientes que se producen principalmente bajo los individuos adultos ya establecidos, podría ser fundamental para el reclutamiento, establecimiento y supervivencia de nuevos individuos, al ofrecer condiciones menos rigurosas que su entorno (4,5,7,8). Se ha encontrado que el efecto de la facilitación juega un papel muy importante sobre la riqueza y diversidad de plantas en comunidades de alta montaña en los Andes, principalmente a través del aumento en la disponibilidad hídrica, debido al amortiguamiento de las temperaturas extremas bajo la copa de la vegetación (2,3,11,21).

En los Andes Venezolanos se han llevado a cabo investigaciones que representan importantes aportes sobre el papel del arbusto *Hypericum laricifolium* como IE en la alta montaña, donde se ha reportado que la influencia de esta especie puede aumentar la riqueza de especies en relación a las áreas abiertas, encontrándose asociaciones tanto positivas como negativas entre el arbusto y otras especies de la comunidad, pero con una prevalencia de las asociaciones positivas (6,13,21), derivadas de las modificaciones microambientales debido a la presencia de su copa, registrándose disminuciones significativas de la radiación, temperatura del suelo y

un aumento en la humedad relativa del suelo y de la materia orgánica de hasta un 35% (6,21).

En este sentido, nos planteamos estudiar las interacciones planta-planta del arbusto *H. laricifolium* en un gradiente altitudinal que incluye cuatro sitios ubicados sobre los 4000 msnm, donde su papel como IE no ha sido estudiado.

Sitio de estudio

Para llevar a cabo el presente trabajo en el Páramo de Piedras Blancas se escogieron cuatro sitios ubicados a diferentes altitudes (4100, 4200, 4300, 4400 msnm). En cada uno de los sitios de muestreo se establecieron dos situaciones: 1) bajo la influencia del arbusto *H. laricifolium* (BA), y 2) fuera del arbusto, ubicada en lugares escogidos al azar que no se encuentran bajo la influencia de la copa de *H. laricifolium* (FA), donde se llevaron a cabo las determinaciones indicadas a continuación.

Resultados y discusión

Caracterización microclimática

La sombra que proviene de los doseles de arbustos o árboles disminuye la incidencia de altas radiaciones, reduce las amplitudes térmicas y disminuye la evaporación del agua bajo el dosel, promoviendo un aumento en la humedad del suelo, en comparación con el suelo desnudo de los alrededores, y en general, un mejor equilibrio en el estado hídrico de la planta (9,18,20,21). El aumento de la humedad del suelo vinculado a la reducción de la evapotranspiración se ha identificado como un mecanismo clave que impulsa los efectos positivos de las plantas facilitadoras sobre sus beneficiarias (18). Además, se ha encontrado que una mayor acumulación de materia orgánica del suelo (MOS) bajo la copa de arbustos genera variaciones diarias de temperatura más pequeñas y aumenta la retención de humedad en el suelo (20).

El efecto de la presencia de *H. laricifolium* en la atenuación de las temperaturas se puede observar en la **Fig. 1**, donde se muestra el perfil diario promedio de las temperaturas del suelo durante un periodo de 46 días. Las temperaturas del suelo muestran que efectivamente la presencia del arbusto tiene un efecto importante en la atenuación de las temperaturas extremas, reduciendo el intervalo de amplitudes térmicas que representan un estrés para la comunidad vegetal que ahí se desarrolla. Esto se traduce en temperaturas más cálidas durante la noche y más frías durante el día, produciendo una disminución de más de 10°C durante las horas del día donde hay mayor incidencia de radiación y por ende, las temperaturas aumentan considerablemente.

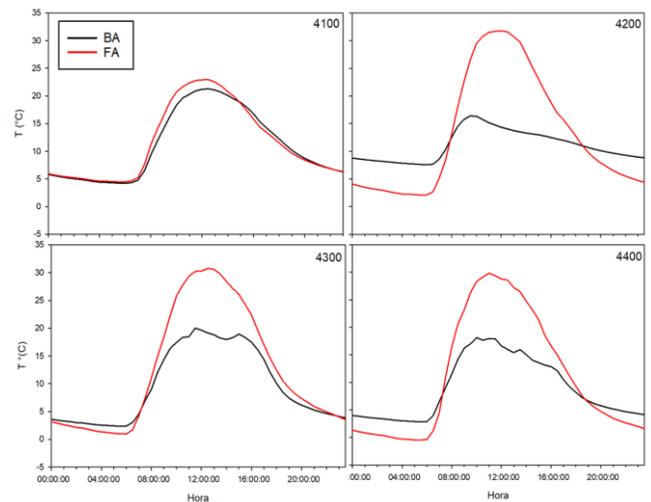


Fig. 1. Perfil diario de temperaturas del suelo registradas durante un periodo de 46 días, bajo la copa del arbusto *Hypericum laricifolium* (línea negra) y las áreas abiertas (línea roja), a 4100, 4200, 4300 y 4400 msnm.

En la **Tabla 1** se muestran los resultados de algunos parámetros microclimáticos determinados durante nuestro estudio. Las regiones de las altas montañas tropicales se caracterizan por presentar altas radiaciones incidentes y su intensidad incrementa a medida que aumenta la altura (1). Esta tendencia se pudo observar claramente en nuestros resultados, ya que hubo un incremento importante en la radiación promedio a lo largo del gradiente altitudinal, siendo considerablemente mayor en el sitio más alto. Además, se observa que la cobertura por parte de la copa del arbusto *H. laricifolium* disipa de manera importante la radiación incidente promedio a nivel local, en comparación con las áreas fuera de la influencia del arbusto, lo que a su vez, está relacionado con la disminución de las temperaturas durante las horas cercanas al mediodía.

En las zonas de alta montaña se ha descrito que la MOS decrece con la altitud, y alcanza valores cercanos a cero en sustratos sin vegetación (17). Nuestros resultados muestran claramente lo descrito en la literatura, ya que los valores de MOS encontrados disminuyeron significativamente con la altitud, como una consecuencia de la reducida cobertura vegetal en los sitios de estudio más altos. A pesar de que nuestros porcentajes de MOS fueron bajos (entre 5 y 14%), anteriormente se han reportado valores aún más bajos en los páramos andino y altiandino (entre 2 y 4%) (21). Por su parte, contrario a lo que se esperaba no se observó un efecto claro de la presencia del arbusto *H. laricifolium*. Esto pudo deberse a que el muestreo realizado a una profundidad de entre 5 y 10 cm del suelo no permitió observar diferencias claras, debido a que la influencia de las plantas sobre la materia orgánica es mayor en

los horizontes superiores del suelo, limitándose principalmente al área bajo el dosel de la planta o inmediatamente adyacente a ella, ya que las modificaciones del suelo desaparecen rápidamente con el aumento de la distancia desde tallo de la planta (16,23).

Tabla 1. Radiación fotosintéticamente activa PAR ($\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$), contenido relativo de humedad en el suelo CRHS (%) y materia orgánica del suelo MOS (%) bajo la copa del arbusto *Hypericum laricifolium* (BA) y en áreas abiertas (FA), a 4100, 4200, 4300 y 4400 msnm. Para PAR, letras diferentes indican diferencias significativas entre situaciones (BA y FA) a $p < 0,05$. Para CRHS y MOS, letras diferentes indican diferencias significativas entre alturas a $p < 0,05$. Valores medios \pm error estándar.

Altitud (msnm)	Situación	PAR ($\mu\text{moles m}^{-2} \text{seg}^{-1}$)	CRHS (%)	MOS (%)
4100	BA	646,99 \pm 144,08 (b)	8,46 \pm 0,77 (bc)	13,24 \pm 1,45 (a)
	FA	1612,97 \pm 105,40 (a)	7,02 \pm 0,97 (bc)	13,64 \pm 0,71 (a)
4200	BA	339,90 \pm 65,36 (b)	8,54 \pm 0,71 (b)	10,54 \pm 0,63 (b)
	FA	1471,64 \pm 104,88 (a)	8,45 \pm 0,93 (b)	10,66 \pm 1,34 (b)
4300	BA	600,14 \pm 87,78 (b)	10,32 \pm 0,71 (b)	5,59 \pm 0,54 (c)
	FA	1742,98 \pm 66,35 (a)	10,91 \pm 0,93 (b)	5,05 \pm 0,78 (c)
4400	BA	367,58 \pm 50,76 (b)	18,56 \pm 2,43 (a)	6,34 \pm 0,66 (c)
	FA	2273,56 \pm 115,02 (a)	19,21 \pm 0,68 (a)	4,86 \pm 0,55 (c)

Los gradientes altitudinales en los sistemas montañosos se han usado a menudo para estudiar las interacciones entre plantas, asumiendo que las elevaciones más altas son más estresantes para las plantas principalmente por las temperaturas extremas y por las altas radiaciones (22). Sin embargo, las plantas en sistemas montañosos en ambientes secos pueden sufrir, además, del estrés hídrico a elevaciones bajas (10). Este gradiente de estrés cruzado se reflejó en nuestros resultados reportándose una disminución de la humedad en el suelo en los sitios menos elevados de nuestro gradiente altitudinal. Nuestros resultados no muestran un efecto claro de la presencia del arbusto *H. laricifolium* sobre el contenido de humedad en el suelo, quizás por la profundidad a la que fueron tomadas las muestras, tal y como se explica en el caso de la MOS. Sin embargo, Cáceres *et al.* (6) y Ramírez *et al.* (15) reportan valores mayores de contenido de agua bajo la cobertura del arbusto que en las áreas abiertas en diferentes sitios del Páramo de Piedras Blancas, y

esto es consistente con los efectos de *H. laricifolium* a nivel comunitario que se registraron en el presente trabajo, los cuales se presentan a continuación.

Efectos de H. laricifolium a nivel comunitario: riqueza y diversidad de especies

La **Tabla 2** muestra que la presencia del arbusto tuvo un efecto sobre la riqueza y la diversidad de la comunidad, y que la intensidad de este efecto varía a lo largo del gradiente altitudinal establecido. Aunque en los cuatro sitios de estudio se observó que la copa del arbusto *H. laricifolium* aumentó la riqueza y diversidad de especies con respecto a las áreas abiertas, en los dos sitios de menor altitud este efecto fue mayor en comparación con los sitios de mayor altitud. Los resultados obtenidos sugieren que la facilitación neta a nivel de la comunidad es más fuerte en los sitios de menor elevación. Esto parece indicar que la facilitación mediada por el arbusto está relacionada con un mayor estrés hídrico en las zonas más bajas. Cavieres *et al.* (10) sugieren que si bien el estrés térmico aumenta con la elevación en ambientes alpinos, en algunos casos la baja disponibilidad de humedad podría ser un factor más importante.

Tabla 2. Riqueza promedio de las especies e Índice de Diversidad de Shannon (H') registradas en áreas bajo el arbusto *Hypericum laricifolium* (BA) y en áreas abiertas (FA), a 4100, 4200, 4300 y 4400 msnm. Letras diferentes indican diferencias significativas entre situación (BA y FA) a $p < 0,05$. Valores medios \pm error estándar.

Altitud (msnm)	Situación	Riqueza (n° de especies)	Diversidad (H')
4100	BA	7 \pm 0,26 (a)	0,69 \pm 0,02 (a)
	FA	4 \pm 0,28 (b)	0,40 \pm 0,03 (b)
4200	BA	6 \pm 0,31 (a)	0,64 \pm 0,03 (a)
	FA	3 \pm 0,32 (b)	0,36 \pm 0,04 (b)
4300	BA	5 \pm 0,32 (a)	0,57 \pm 0,03 (a)
	FA	4 \pm 0,39 (b)	0,44 \pm 0,04 (b)
4400	BA	5 \pm 0,35 (a)	0,61 \pm 0,03 (a)
	FA	4 \pm 0,42 (b)	0,44 \pm 0,04 (b)

Entonces, si las especies arbustivas actúan como IE, la conservación de los arbustos en la alta montaña debe ser una preocupación central para el mantenimiento de la diversidad y restauración de hábitats particularmente estresados (14).

Agradecimientos

Al personal del Instituto de Ciencias Ambientales y Ecológicas (ICAE) de la Universidad de Los Andes, Mérida, por brindarnos apoyo humano y logístico que hizo posible el trabajo de campo.

Referencias

1. **Azócar, A., y Rada F.** (2006). **Ecofisiología de Plantas de Páramo.** Instituto de Ciencias Ambientales y Ecológicas. Facultad de Ciencias. Universidad de los Andes. Mérida, Venezuela, 182 p.
2. **Badano, E.I. y Cavieres, L.A.** (2006). Ecosystem engineering across ecosystems: do engineer species sharing common features have generalized or idiosyncratic effects on species diversity? **Journal of Biogeography**, **33**(2): 304-313.
3. **Badano, E.I., Jones, C.G., Cavieres, L.A. y Wright, J.P.** (2006). Assessing impacts of ecosystem engineers on community organization: a general approach illustrated by effects of a high Andean cushion plant. **Oikos**, **115**(2): 369-385.
4. **Billings, W.D.** (1974). Adaptations and origins of alpine plants. **Arctic and Alpine Research**, **6**: 129-142.
5. **Bueno, A. y Llambí, L.D.** (2015). Facilitation and edge effects influence vegetation regeneration in old-fields at the tropical Andean forest line. **Applied Vegetation Science**, **18**(4): 613-623.
6. **Cáceres, A., Llambí, L.D. y Rada, F.** (2014). Shrubs as foundation species in a high tropical alpine ecosystem: a multi-scale analysis of plant spatial interactions. **Plant Ecology & Diversity**, **8**(2): 147-161.
7. **Callaghan, T.V. y Emanuelsson, U.** (1985). Population structure and processes of tundra plants and vegetation. En: White, J. (Ed.). **The population structure of vegetation.** Netherlands: 399-439.
8. **Callaghan, T.V.** (1987). Plant population processes in arctic and boreal regions. **Ecological Bulletins**, **38**: 58-68.
9. **Callaway, R.M.** (2007). Interaction between competition and facilitation. En: Callaway, R.M. (Ed.). **Positive Interactions and Interdependence in Plant Communities.** Springer. Missoula: 179-254.
10. **Cavieres, L.A., Badano, E.I., Sierra-Almeida, A., Gómez-González, S. y Molina-Montenegro, M.A.** (2006). Positive interactions between alpine plant species and the nurse cushion plant *Laretia acaulis* do not increase with elevation in the Andes of central Chile. **New Phytologist**, **169**(1): 59-69.
11. **Cavieres, L.A. y Badano, E.I.** (2009). Do facilitative interactions increase species richness at the entire community level? **Journal of Ecology**, **97**(6): 1181-1191.
12. **Connell, J.H., y Slatyer, R.O.** (1977). Mechanisms of succession in natural communities and their role in community stability and organization. **American Naturalist**, **111**(982): 1119-1144.
13. **Fariñas, M.R., Lázaro, N. y Monasterio, M.** (2008). Ecología comparada de *Hypericum laricifolium* Juss. y de *H. juniperinum* Kunth en el valle fluvio-glacial del Páramo de Mucubají. Mérida, Venezuela. **Ecotrópicos**, **21**(2): 75-88.
14. **Farji-Brener, A.G., Chinchilla, F.A., Magrath, A., Romero, V., Ríos, M., Velilla, M., Serrano, J. y Amador-Vargas, S.** (2009). Slope orientation enhances the nurse effect of a paramo shrub, *Hypericum irazuense* (Hypericaceae) in Costa Rica. **Journal of Tropical Ecology**, **25**(03): 331-335.
15. **Galen, C. y Stanton, M.L.** (1993). Short-Term Responses of Alpine Buttercups to Experimental Manipulations of Growing Season Length. **Ecology**, **74**(4): 1052-1058.
16. **García-Moya, E. y McKell, C.M.** (1970). Contribution of shrubs to the nitrogen economy of a desert-wash plant community. **Ecology**, **51**(1): 81-88.
17. **Körner, C.** (2003). **Alpine plant life: functional plant ecology of high mountain ecosystems.** Springer Science & Business Media, Alemania, 359 pp.
18. **Maestre, F.T., Bautista, S. y Cortina, J.** (2003). Positive, negative, and net effects in grass-shrub interactions in Mediterranean semiarid grasslands. **Ecology**, **84**(12): 3186-3197.
19. **Molina-Montenegro, M.A., Torres, C., Parra, M.J. y Cavieres, L.A.** (2000). Asociación de especies al cojín *Azorella trifurcata* (Gaertn.) Hook. (Apiaceae) en la zona andina de Chile central (37°S). **Gayana Bot**, **57**(2): 161-168.
20. **Pugnaire, F.I., Armas, C. y Valladares, F.** (2004). Soil as a mediator in plant-plant interactions in a semi-arid community. **Journal of Vegetation Science**, **15**(1): 85-92.
21. **Ramírez, L.A., Rada, F. y Llambí, L.D.** (2015). Linking patterns and processes through ecosystem engineering: effects of shrubs on microhabitat and water status of associated plants in the high tropical Andes. **Plant Ecology**, **216**(2): 213-225.
22. **Schöb, C., Armas, C., Guler, M., Prieto, I. y Pugnaire, F.** (2013). Variability in functional traits mediates plant interactions along stress gradients. **Journal of Ecology**, **101**: 753-762.
23. **Zinke, P.J. y Crocker, R.L.** (1962). The influence of Giant Sequoia on soil properties. **Forest Science**, **8**(1): 2-11.

Intercambio gaseoso en café y su respuesta al déficit hídrico

WILMER TEZARA^{1,2}, DANIEL LOYAGA², PATRICIA MENDOZA²,
MILTON BOLAÑOS² Y VICTOR REYNEL²

¹Laboratorio de Ecofisiología de Xerófitas; Centro de Botánica Tropical

Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela

Apartado 47114. Caracas 1041A, Venezuela. Correo: wilmer.tezara@ciens.ucv.ve

²Facultad de Ciencias agropecuarias y Ambientales de la Universidad Técnica Luis Vargas Torres,
Estación Experimental Mútila, Esmeraldas

El café de origen africano, es considerado uno de los cultivos leñosos tropicales más importantes a nivel mundial. En Ecuador tienen información de producción y tolerancia a enfermedades de muchos cultivares de café, pero carecen de información ecofisiológica, la cual es necesaria para entender las respuestas de aclimatación del cultivo a las diferentes condiciones ambientales. Con el fin de conocer la capacidad fotosintética de 10 cultivares de *Coffea arabica* (arábigo) y 15 clones de *Coffea canephora* (robusta), se evaluó el intercambio gaseoso (IG): tasa de fotosíntesis (A), transpiración (E), conductancia estomática (g_s) y eficiencia de uso de agua (EUA). Se evaluó el efecto del déficit hídrico (DH) sobre el IG en *C. arabica*. La A varió entre cultivares arábigos y clones robusta entre 8 y 15 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y g_s entre 150 y 375 $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. El café arábigo fue sensible al DH, mostrando una respuesta diferencial en las variables de IG entre cultivares y tratamiento. La EUA fue significativamente mayor en Cavimor Mn, Pache enano y en los clones robusta (ECU ROBUSTA 01, CONILON 1 y CONILON 2), por lo que podrían tener una alta productividad en zonas cafeteras.

Introducción

El café se considera el principal producto agrícola de consumo en el mundo con un mercado que genera anualmente más de 90 billones de dólares. Cerca del 8% de la población mundial (500 millones de personas), está involucrado en el mercado del café, desde su siembra hasta su consumo final, representando una de las bebidas favoritas y preferidas más consumidas del planeta, con un consumo que crece a una tasa promedio anual del 2% (2011-2015). Actualmente, la producción de café asciende a 115 millones de sacos (60 kg) de café beneficiado (4).

El café es un cultivo leñoso tropical nativo de regiones tropicales de África (Norte de Etiopía). Es un árbol de 10 a 12 metros que pertenece a la familia de las Rubiaceae; de las 100 especies del género *Coffea*, sólo *Coffea arabica* L. y *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner, son económicamente de importancia, que en conjunto representan el 99% de la producción mundial de café en grano, produciéndose 64-75% arábica y el resto de robusta (4). También se cultivan, en una escala mucho menor (1%), las especies *Coffea liberica*, *Coffea racemosa*, *Coffea sthenophylla* y *Coffea abeokutae*. Tradicionalmente el café es considerado una especie de sombra, con bajas tasas máximas de fotosíntesis a luz saturante ($A_{DFFS_{\text{sat}}}$), bajo punto de saturación de luz (PSL) y bajas tasa de respiración en oscuridad (R_D) relativamente, con altas eficiencia cuánticas; Φ_{CO_2} (2,9).

La capacidad fotosintética del café, determinada bajo condiciones saturante de luz y CO_2 (~ 5 kPa),

alcanza valores de hasta 30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (2). Los bajos valores de la tasa de fotosíntesis neta (A) *in situ* se han asociado con limitaciones difusivas (estomática y mesofilar), más que a las limitaciones bioquímicas (1,2). En la literatura se han reportado valores promedio de A de 7,2 y 8,3 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y de conductancia estomática (g_s) de 108 y 148 $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, para el café arábica y conilon, respectivamente (3).

Existen extensas revisiones de la fisiología del café Brasileño, tanto en *C. arabica* como en *C. canephora*, incluidas las relaciones hídricas y la tolerancia a la sequía, aclimatación fotosintética a la luz, metabolismo del nitrógeno, los impactos de temperaturas extremas, la sequía y elevadas concentraciones de CO_2 sobre la fisiología y producción del café (grupo de Fábio DaMatta y colaboradores).

A pesar de la existencia de una extensa investigación ecofisiológica sobre el café en el Brasil, todavía existe desconocimiento de muchos procesos fisiológicos, acentuándose esta situación en el Ecuador, de tal manera que en nuestro estudio reportaremos información relevante e importante de la capacidad fotosintética en café arábica y robusta en Esmeraldas, norte de Ecuador (5,6,7,8).

La información generada en este trabajo nos permitirá seleccionar cultivares y/o clones de café que tengan un buen desempeño fisiológico, una mayor capacidad fotosintética y/o mejor eficiencia de uso de agua (EUA) y que se vean menos afectado por el déficit hídrico (DH).

Se evaluó el intercambio gaseoso (IG): A, tasa de transpiración (E), g_s , y EUA, con un analizador infrarrojo de gases portátil modelo CIRAS 2 (PP Systems, Hitchin, RU) en 10 cultivares de *Coffea arabica* (arábigo) (5,6) y 15 clones de *Coffea canephora* (robusta) (8,9) en plantas de 10 meses de edad, cultivadas en bolsas de 10 kg, con un sustrato de suelo franco arenoso cultivadas en condiciones semi-controladas (umbráculo), ubicado en el Jardín Botánico de la Estación Experimental de Mútilo en la FACAAM-UTELVT en la ciudad de Esmeraldas (**Tabla 1**). Los cultivares y clones fueron seleccionados en función de la productividad y resistencia a enfermedades.

Tabla 1. Diez cultivares de café arábigo y 15 clones de café robusta evaluados.

<i>Coffea arabica</i>		
Variedades	Bourbon Salvador	La isla Bourbon
	Catuái Amarillo	Mundo Novo y Caturra
	Sarchimor 4260	Villa Sarchi x Híbrido de Timor
	Cavimor Mn	Catuái x Catimor
	Sarchimor 1669	Villa Sarchi x Híbrido de Timor
	Caturra rojo	Son mutantes de "Bourbon,
	Catuái rojo	Mundo novo y Caturra
	Catimor ECU 02	Caturra x Híbrido de Timor
	Pache Enano	una mutación de Typica
	Cavimor ECU	Catuái x Catimor
<i>Coffea canephora</i>		
Clones	NP3056P10	Robusta
	NP2024P1	Robusta
	COF-01	Robusta
	COF-06	Conilón
	COF-02	Conilón
	LG-S-02	Robusta
	LG-S-01	Robusta
	SICA 1	Robusta
	SICA 2	Robusta
	SICA 3	Robusta
	SICA 4	Robusta
	SICA5	Robusta
	CONILON 2	Robusta
	ECU ROBUSTA 01	Robusta
	CONILON 1	Robusta

Todas las determinaciones de IG se realizaron en hojas adultas completamente expandidas y sanas, bajo las siguientes condiciones de medidas: concentración de CO₂ ambiental (C_a) 410 ± 10 ppm, 21% de O₂, temperatura foliar de 30 ± 1 °C, densidad de flujo fotónico saturante (DFF) 1200 μmol m⁻² s⁻¹ y un gradiente vapor de agua hoja-aire (VPD) de 1,5 ± 0,1 MPa.

Se realizaron experimentos donde se simuló la sequía induciendo el DH, por suspensión de riego durante un mes, a 5 plantas de cada cultivar de café

arábigo, obteniendo así un grupo de 50 plantas sometidas a DH y otro grupo de 50 plantas controles (bien irrigadas) (5,6).

Se evaluó el efecto del DH sobre variables de estado hídrico e intercambio gaseoso al inicio del experimento (día 0) y los días 8, 15, 22, 29 del tratamiento de DH y al día 30 luego de la riego, donde se determinó cuáles cultivares responden mejor a la riego.

Intercambio gaseoso en café arábigo y robusta

En todos los cultivares de café se observaron las más bajas A al inicio de las evaluaciones, debido al proceso de aclimatación que sufrieron las plantas de café, al ser trasplantadas a bolsas de plástico de mayor volumen. Luego de 4 meses, la A se estabilizó en la mayoría de los cultivares, encontrando las mayores A en los cultivares arábigos (Cavimor ECU, Pache enano, Caturra rojo y Catuai rojo), y las menores para Bourbon salvador y Catuai amarillo (6,7), mientras que la A fue mayor en los clones robustas (CONILON 1 y ECU ROBUSTA 01) (**Tabla 2**).

Tanto en los cultivares de café arábigo como en los clones de café robusta se observó que hubo diferencias significativas en los parámetros de intercambio gaseoso evaluados (**Tabla 2**). Los clones CONILON 1, CONILON 2 Y ECU ROBUSTA 01 mostraron las mayores A y mayor EUA, en comparación con los obtenidos en NP3056 P10, SICA 2 y NP 2024 P1 (7,8).

Sin embargo, en promedio no se observaron diferencias significativas en A y g_s entre el café arábigo y el café robusta (5,6,7,8) (**Tabla 2**).

La E varió entre valores de 3-4 mmol m⁻² s⁻¹ en todos los cultivares y clones de café. La g_s en promedio estuvo alrededor de 310 mmol m⁻² s⁻¹, aunque se observaron cultivares con $g_s > 350$ mmol m⁻² s⁻¹.

La EUA, evaluada como la relación A/E, siguió la misma tendencia que la observada en A, es decir, fue significativamente mayor en CONILON 1, CONILON 2 y ECU ROBUSTA, seguidos por los arábigos (Cavimor Mn, Cavimor ECU, Pache enano), mientras que las menores se encontraron en Bourbon salvador y Catuai amarillo (**Tabla 2**).

Se encontró una relación lineal significativa entre A y g_s en café arábigo (5,6,10,11,12), mientras que no se observó esta correlación en clones de café robusta (7,8,10,12).

En los cultivares de café arábigos estudiados, la A y el VPD tuvo una relación curvilínea negativa, significativa ($r^2=0,62$, $p<0,05$), es decir a mayores valores VPD, causa una disminución en A, producto de menores g_s (5,6,10,12). Por el contrario, la A fue

independiente del VPD en los diferentes clones de café robusta, sugiriendo que probablemente en el café robusta evaluado en buena condición hídrica y nutricional, no existe un control estomático fuerte, es decir, la respuesta de la g_s al VPD fue pequeña o ausente (7,8,10,11,12).

Tabla 2. Intercambio gaseoso: tasa de fotosíntesis (A), tasa de transpiración (E), conductancia estomática (g_s) y eficiencia de uso de agua (EUA) de 10 cultivares de café arábigo y 15 clones de café robusta con buen suministro hídrico y nutricional, en plantas creciendo en el invernadero del Jardín Botánico de Mútile.

	A	E	g_s	EUA
	($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	(mmol mol^{-1})
C. arabica				
Bourbon Salvador	9,8 ± 0,7	4,1 ± 0,4	301,2 ± 48	2,5 ± 0,3
Catuai amarillo	9,5 ± 0,8	4,3 ± 0,1	309,6 ± 35	2,2 ± 0,2
Catuai rojo	11,3 ± 1,1	3,5 ± 0,5	227,8 ± 48	3,3 ± 0,2
Sarchimor 4260	11,3 ± 0,4	4,2 ± 0,3	321,8 ± 38	2,7 ± 0,2
Sarchimor 1669	10,9 ± 0,6	3,9 ± 0,4	284,2 ± 40	2,8 ± 0,3
Cavimor Mn	11,9 ± 1,3	3,6 ± 0,6	284,8 ± 29	3,6 ± 0,4
Caturra rojo	11,7 ± 0,6	4,1 ± 0,3	341,4 ± 43	2,9 ± 0,2
Catimor ECU 02	10,9 ± 0,9	4,6 ± 0,3	411,8 ± 38	2,4 ± 0,3
Pache Enano	13,6 ± 1,2	4,4 ± 0,3	337,2 ± 43	3,1 ± 0,1
Cavimor ECU	11,8 ± 1,1	3,7 ± 0,3	260,6 ± 33	3,2 ± 0,1
Media ± ES	11,3 ± 0,4	4,0 ± 0,11	308,0 ± 16	2,8 ± 0,13
C. canephora				
NP 3056 P10	9,5 ± 0,5	4,3 ± 0,4	375,9 ± 37	2,6 ± 0,4
SICA 4	10,4 ± 0,8	3,0 ± 0,3	198,3 ± 19	3,9 ± 0,5
SICA 5	10,8 ± 0,7	3,3 ± 0,3	223,5 ± 17	3,9 ± 0,6
NP - 2024 P1	10,8 ± 0,3	4,7 ± 0,5	303,2 ± 34	2,8 ± 0,4
SICA 2	10,9 ± 0,9	3,5 ± 0,3	267,2 ± 26	3,6 ± 0,6
COF - 06	11,0 ± 0,5	4,2 ± 0,4	317,0 ± 32	3,2 ± 0,4
SICA 1	11,2 ± 0,5	3,4 ± 0,3	229,2 ± 21	4,0 ± 0,6
COF - 02	11,2 ± 0,6	4,0 ± 0,3	295,7 ± 26	3,2 ± 0,4
SICA 3	11,3 ± 0,7	3,6 ± 0,3	251,5 ± 20	3,6 ± 0,5
LG - S - 02	11,4 ± 0,5	4,3 ± 0,4	266,3 ± 41	3,1 ± 0,4
COF - 01	12,5 ± 0,6	4,4 ± 0,3	355,5 ± 32	3,2 ± 0,4
CONILON 2	12,9 ± 0,6	3,2 ± 0,4	226,0 ± 28	5,6 ± 1,0
LG - S - 01	13,2 ± 0,6	4,2 ± 0,3	349,5 ± 31	3,5 ± 0,5
CONILON 1	13,3 ± 0,7	3,1 ± 0,3	223,1 ± 18	5,9 ± 1,1
ECU ROBUSTA 01	15,1 ± 0,7	3,9 ± 0,4	284,2 ± 27	4,9 ± 0,8
Media ± ES	11,7 ± 0,4	3,8 ± 0,13	277,7 ± 14	3,8 ± 0,24

Efecto del DH sobre el IG en café arábigo

Los mayores contenidos de agua foliar fueron observados en Pache enano, Catuaí amarillo, Cavimor Mn y Sarchimor 4260. Se observaron diferencias significativas en contenido relativo de agua y área foliar específica entre cultivares y DH. En todos los casos hubo una reducción considerable en el contenido de agua del suelo (entre el 70-90 %), con el DH. Se observó una recuperación en el estado hídrico de las plantas luego de la reirrigación (5,6). Para el día 22 de tratamiento hídrico, se observaron diferencias significativas en la A entre los cultivares de café arábigo estudiado, entre DH y la interacción (cultivares x DH), indicándonos que existe una

respuesta diferencial de la A al DH en café arábigo (5,6,10,11,12).

La mayor A fue observada en Cavimor ECU y Pache enano, cultivares que mantuvieron la A hasta 22 días de DH sin variación, ambos cultivares mostraron una rápida recuperación luego de transcurridos 24h de haber sido irrigados.

Se encontró que Pache enano, Catimor ECU 02, Cavimor ECU, Catuaí rojo, Sarchimor 1669 fueron los cultivares más tolerantes al DH, mientras que Catuaí amarillo, Cavimor Mn, Sarchimor 4260 los más susceptibles, sin lograrse recuperar luego de haber sido irrigados (5,6).

Se encontró una relación lineal significativa entre A y g_s en cultivares de café arábigo sometidos a DH, donde las variaciones de g_s explican un 64% de los cambios en A. Los menores valores de A se observaron en plantas sometidas a los 29 días de DH (Fig. 1).

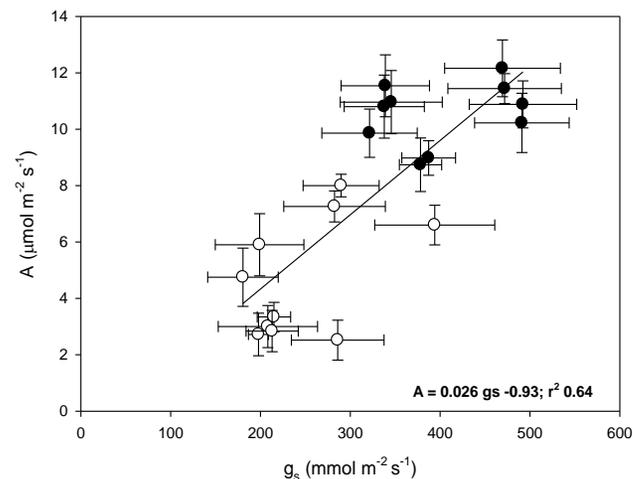


Fig. 1. Relación entre la tasa de fotosíntesis (A) y la conductancia estomática (g_s) en diez cultivares de café arábigo, plantas control (círculos negro) y sometidos a déficit hídrico por 29 días (círculos blancos). $A=0,026 g_s - 0,93$; $r^2 = 0,64$; $p < 0,05$.

En los cultivares Catuaí rojo, Cavimor ECU 02 y Sarchimor 1619, la A disminuyó de manera lenta y gradual; luego de 24 h de haber sido irrigados tuvieron una rápida recuperación. Pache enano mantuvo constante la A, a excepción del día 22, cuando disminuyó y luego incrementó, manteniéndose así hasta la reirrigación. Este cultivar, a pesar de su bajo porte, podría ser recomendado en los programas de cruzamiento y/o mejoramiento genético, dada su alta A, EUA y buena respuesta al DH.

Se observaron diferencias significativas en la g_s entre el tratamiento del DH, encontrándose una disminución en g_s con el DH en algunos cultivares.

No hubo diferencias significativas en E entre cultivares, DH e interacción (cultivares x DH), para el día 22 de DH (5,6,10,12).

El hecho de que A disminuyó con el DH, sin producir cambios significativos en E, se tradujo en una reducción de la EUA; esta variable mostró diferencias significativas entre cultivares, DH e interacción (cultivares x DH), tanto en el día 22 como en la irrigación.

El café arábigo fue sensible al DH, mostrando una respuesta diferencial entre cultivares y DH en la mayoría de las variables de IG. Los cultivares arábigos (Pache enano, Catimor ECU 02, Cavimor ECU, Catuaí rojo, Sarchimor 1669) fueron los más resistentes al DH, mientras que Catuaí amarillo, Cavimor Mn, Sarchimor 4260 los más susceptibles. Los cultivares Cavimor ECU, Pache enano tuvieron las mayores A y EUA, mantuvieron estos parámetros hasta 22 días de DH y mostraron una recuperación total con la irrigación, sugiriendo que estos cultivares podrían ser seleccionados para su cultivo en zonas donde exista periodos de baja disponibilidad hídrica; sin embargo, es requerida con urgencia mayor investigación en condiciones naturales.

La EUA fue significativamente mayor en Cavimor ECU, Pache enano, Caturra rojo y Catuaí rojo, mientras que las menores se encontraron en Bourbon y Catuaí amarillo. Concluimos que la A y la EUA podrían ser indicadores de la tolerancia que poseen los cultivares de café arábigo al DH.

Los clones ECU ROBUSTA 01, CONILON 1 y CONILON 2 mostraron las mayores A y EUA, por lo que podrían tener una alta productividad en la zona de Esmeraldas.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por el programa PROMETEO- SENESCYT de la República del Ecuador: "Limitaciones estomáticas y metabólicas de la asimilación de CO₂ en cultivares de café y palma aceitera y su relación con la productividad en Esmeraldas" (WT).

Referencias

1. **DaMatta, F.M.** (2003). Drought as a multidimensional stress affecting photosynthesis in tropical tree crops. En: Hemantaranjan A (ed.). Scientific Publishers, Jodhpur. **Advances in Plant Physiology**, 5: 227-265.
2. **DaMatta, F.M., Loos, R.A., Rodrigues, R. y Barros, R.S.** (2001). Actual and potential photosynthetic rates of tropical crop species. **Braz. J. Plant Physiol.**, 13: 24-32.
3. **DaMatta, F.M., Ronchi, C.P., Sales, E.F. y Araujo, J.B.S.** (2007). O café conilon em sistemas agroflorestais. En: Ferrão, R.G., Fonseca, A.F.A., Bragança, S.M., Ferrão, M.A.G. y De Muner, L.H. (eds). **Café Conilon**. Seag/Incaper, Vitória: 377-389.
4. **ICO.** (2016). Organización Internacional del Café http://www.ico.org/new_historical.asp.
5. **Loyaga, D.** (2017). Caracterización agronómica y fisiológica de 10 cultivares de café arábica (*Coffea arabica*) y su respuesta al déficit hídrico. Trabajo Especial de Grado para optar al título de Ingeniero Agrónomo. UTELVT, 66 p.
6. **Loyaga, D., Reynel, V., Bolaños, M., Mendoza, P., Valencia, E. y Tezara, W.** (2017). Efecto del déficit hídrico sobre la fisiología y variables agronómicas de 10 cultivares de café arábica. **Primeras Jornadas de Investigación Ciencia e Innovación (JICI 2017)**. 29 nov. - 01 dic. 2017, Esmeraldas Ecuador.
7. **Mendoza, P.** (2017). Evaluación de la capacidad fotosintética de 15 cultivares de *Coffea canephora* (Robusta) en la estación Experimental de Mútiles en Esmeraldas. Trabajo Especial de Grado para optar al título de Ingeniero Agrónomo. UTELVT, 50 p.
8. **Mendoza, P., Loyaga, D., Reynel, V., Bolaños, M. y Tezara, W.** (2017). Capacidad fotosintética de 15 clones de café robusta (*Coffea canephora*) en la estación experimental Mútilo. **Primeras Jornadas de Investigación Ciencia e Innovación (JICI 2017)**. 29 nov. - 01 dic. 2017, Esmeraldas Ecuador.
9. **Tezara, W.** (2017a). Características ecofisiológicas y productivas del café y cacao. En: **Bases Agronómicas, fisiológicas y tecnológicas de café y cacao**. Tezara W & Escalante E. (editores). ISBN 978-9942-8657-6-2. Editorial CIDE, Ecuador: 12-27.
10. **Tezara, W.** (2017b). Ecofisiología del café (*Coffea arabica* y *Coffea canephora*). Conferencia en la Universidad Estatal Amazónica.
11. **Tezara, W.** (2017c). Caracterización fotosintética del café (*Coffea arabica* y *Coffea canephora*) en Ecuador implicaciones en el cambio climático, conferencia en REDUCAFE en Quevedo.
12. **Tezara, W. y Escalante, E.** (2017). Editores del Libro **Bases Agronómicas, fisiológicas y tecnológicas de café y cacao**. ISBN 978-9942-8657-6-2. Editorial CIDE, Ecuador, 128 p.

Intercambio gaseoso y actividad fotoquímica en clones de cacao (*Theobroma cacao* L.) cultivados en el sistema agroforestal del INIA-Miranda

HÉCTOR ALEXANDER BLANCO-FLORES¹, ELEINIS ÁVILA-LOVERA^{1,2},
OLGA MOVIL¹ Y WILMER TEZARA¹

¹Laboratorio de Ecofisiología de Xerófitas, Centro de Botánica Tropical
Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela
Calle Suapure, Colinas de Bello Monte. Caracas 1041-A, Venezuela. ²Department of Botany and
Plant Sciences, University of California Riverside, 2150 Batchelor Hall, Riverside, CA 92521, USA.
Correo: hec.blanc@gmail.com

Se midieron parámetros de intercambio gaseoso (PIGs) y de fluorescencia de la clorofila-*a* (PFs) en 3 clones de cacao, en un sistema agroforestal (SA), para evaluar su desempeño fisiológico bajo la sombra de diferentes árboles maderables: *Tabebuia rosea*, *Swietenia macrophylla*, *Cedrela odorata* y *Cordia thaisiana*. La combinación clon-sombra tuvo un efecto significativo sobre los PIGs mas no en los PFs evaluados (ANOVA 2-vías, $p < 0,05$). El clon 443 bajo la sombra de *C. thaisiana* (443-PAR) fue la combinación con mayor tasa fotosintética (A) y eficiencia en el uso de agua ($13,2 \pm 3,4 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y $3,2 \pm 0,8 \text{ mmol mol}^{-1}$, respectivamente). La conductancia estomática (g_s) sólo explicó 16 % de la variación de A ($P=0,006$). La concentración intercelular de CO_2 (C_i) fue significativamente mayor ($>300 \mu\text{mol mol}^{-1}$) en combinaciones con bajas A y menor ($<250 \mu\text{mol mol}^{-1}$) en combinaciones con altas A. No hubo evidencia de fotoinhibición (valores de eficiencia cuántica máxima $>0,75$) ni efecto clon-sombra sobre el transporte de electrones (ETR). Los resultados sugieren que 443-PAR utiliza más eficientemente los electrones en la reducción del CO_2 , mostrando un mejor desempeño fotosintético en las condiciones edafo-climáticas de la subregión Barlovento y puede ser una combinación promisoría para sequías prolongadas.

Introducción

En algunos lugares del trópico las prácticas de monocultivo, en conjunto con el crecimiento demográfico, ejercen una fuerte presión sobre los suelos causando el empobrecimiento de los mismos y disminución tanto de la productividad de los cultivos como de la biodiversidad (12). Ante este problema, se ha planteado la necesidad de búsqueda de sistemas de producción más diversos que sean sostenibles en el tiempo (8,9,12). El sistema agroforestal (SA) surge como una opción viable para los problemas de baja producción y la degradación de los suelos en los trópicos (8,9).

El SA es la combinación de un cultivo de interés para el productor con árboles, ya sean maderables o no, y su implementación ofrece varias ventajas: a) El productor obtiene beneficios económicos adicionales por los recursos que ofrece el árbol (madera, frutos, hule entre otros), y no depende únicamente del cultivo, b) Favorece un sostenido ciclaje de nutrientes y fijación de nitrógeno de la atmósfera, lo cual enriquece el suelo, aumenta la productividad y puede mantener la biodiversidad local (8,9,12,17), y c) Contribuye a la mitigación de los futuros efectos adversos del cambio climático global por su alto potencial de secuestro de carbono (13). Para Venezuela, se propone al SA de cacao (*Theobroma cacao*) como modelo de producción por varias

razones: esta especie se cultiva en, prácticamente, todo el país, el cacao criollo venezolano es de alta calidad (fino de aroma) y el objetivo en los planes de mejoramiento del cultivo es aumentar su producción y que *T. cacao* es una planta de sombra, por lo que se adapta muy bien a un SA. La limitante con este sistema es que desconocemos cual es la mejor sombra para las plantaciones de cacao en cada región del país (10). Por lo que es necesario determinarla mediante el diseño de ensayos agroforestales que permitan evaluar el efecto de distintas especies arbóreas sobre el desempeño fisiológico, crecimiento y productividad del cacaotal. En el presente estudio, se midieron parámetros tanto de intercambio gaseoso (PIGs) como de fluorescencia de la clorofila *a* (PFs) de 3 clones (genotipos) de *T. cacao*, cultivados en un SA, para evaluar el desempeño fisiológico de estos bajo la sombra de 4 especies de árboles maderables.

Este estudio aporta información sobre cuál es la mejor combinación clon-sombra para la subregión de Barlovento. Los resultados mostrados son preliminares. Adicionalmente, la investigación contribuye en la búsqueda de clones que sean tolerantes a periodos más prolongados de sequía, debido a que, para el año 2050, se pronostica un aumento de la temperatura promedio de 2-3 °C y una disminución de la precipitación (0,6-0,8 mm día⁻¹)

en territorio venezolano (6,11). Se conoce que *T. cacao* es susceptible al déficit hídrico (1,2,3,5,14, 16), por lo que es necesario ofrecer a los cacaocultores materiales de cada región agroecológica que, además de altamente productivos y tolerantes a enfermedades, sean tolerantes a sequías más prolongadas.

Materiales y métodos

Material vegetal y descripción del sitio de estudio:

El SA de cacao se encuentra en la “Estación Experimental Padrón” del INIA, Sector Tapipa, Municipio Acevedo, Estado Miranda, 10°13'14" N; 66°18'57" W, 38 msnm. Tm= 26 °C. Las mediciones se realizaron en época de sequía (marzo y mayo del 2017) en 3 clones de *T. cacao* con características de Trinitario: 415, 443 y 447 bajo la sombra de 4 especies de árboles maderables: *Tabebuia rosea* (Bignoniaceae) (Apamate, APA), *Swietenia macrophylla* (Meliaceae) (Caoba, CAO), *Cedrela odorata* (Meliaceae) (Cedro, CED), *Cordia thaisiana* (Boraginaceae) (pardillo negro, PAR). El SA consiste en un diseño de bloques con 16 parcelas distribuidas aleatoriamente con 3 repeticiones. Cada parcela es una combinación de uno de los clones de cacao con uno de las especies maderables más la leguminosa arbórea *Erythrina fusca*.

Parámetros de intercambio de gases (PIGs): En hojas maduras totalmente expandidas de cada planta de cacao (n=4 plantas por parcela) se midieron la tasa de fotosíntesis instantánea (A), conductancia estomática (g_s), concentración intercelular de CO₂ (C_i) y eficiencia en el uso de agua (EUA) a densidad de flujo fotónico saturante (DFF)= 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, [CO₂]=410 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ y déficit de vapor hoja-aire (VPD)= 1,6 KPa. Las mediciones se realizaron entre 8:00 am y 12:00 pm empleando el sistema portátil de análisis infrarrojo de gases (CIRAS 2, PP SYSTEM, Hitchin, UK) conectado a una cámara de asimilación (PLC, PP SYSTEM, Hitchin, UK). El muestreo se realizó en las 12 combinaciones clon-sombra (3 clones X 4 especies maderables= 12 parcelas).

Parámetros de Fluorescencia de la clorofila a

(PFs): En una hoja madura de cada planta (n= 4 ó 5 por parcela), tapada por 2 h con papel aluminio, se midió el rendimiento cuántico máximo del Fotosistema II (F_v/F_m) y en la misma hoja pero esta vez iluminada con una fuente de luz a 3 DFF (baja, media y alta) se determinaron los PFs restantes: rendimiento cuántico efectivo del Fotosistema II (Φ_{PSII}), tasa de transporte de electrones fotosintético (ETR) y los coeficientes de extinción fotoquímica

(q_p) y no fotoquímica (q_{NP}). Las mediciones se realizaron entre 8:00 am y 12:00 pm empleando el fluorímetro portátil (PAM 2100, Heinz Walz, Effeltrich, Germany). El muestreo se realizó en 7 parcelas distintas (7 combinaciones clon-sombra).

Análisis estadístico: ANOVA de 2 vías (sólo para los PIGs), test post-hoc de Tukey y análisis de correlación utilizando el programa STATISTICA. Para todos los casos se eligió un nivel de significación de $P < 0,05$.

Resultados y discusión

La interacción clon-sombra tuvo un efecto significativo sobre todos los PIGs medidos (ANOVA 2 vías, $p < 0,05$). El clon 443 bajo la sombra de *C. thaisiana* (PAR) fue la combinación que mostró mayor A y EUA ($13,2 \pm 3,4 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y $3,2 \pm 0,8 \text{ mmol mol}^{-1}$, respectivamente). El menor valor de A y EUA fue registrado para el mismo clon pero bajo la sombra de *C. odorata* (CED) (**Fig. 1**). Los resultados de estos dos PIGs permiten considerar al clon 443 bajo la sombra de PAR como la combinación de siembra que, en época de sequía, presenta el mejor desempeño fotosintético en las condiciones edafo-climáticas del SA. Esta consideración con el clon 443 coincide con trabajos previos en el mismo SA, los cuales señalaron a este clon como el que presenta mayor $A_{\text{CO}_2\text{Sat}}$ ($12,8 \pm 0,8 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) (4,5).

En el establecimiento de un SA de cacao, ubicado en el Sur del Lago de Maracaibo, Venezuela, en el cual se sembraron las mismas 4 especies maderables, el árbol PAR mostró las mayores tasas de crecimiento y de supervivencia y no sufrió ataques por insectos (7).

En el presente estudio, la variación observada para g_s no permite explicar el patrón obtenido en A ($R^2=0,155$, $P=0,006$). Las combinaciones clon-sombra con mayor C_i ($>300 \mu\text{mol mol}^{-1}$) (**Fig. 2**) corresponden a aquellas con los valores bajos de A (**Fig. 1**). Lo contrario, la combinación 443-PAR registró uno de los menores valores de C_i a pesar de su significativamente mayor A. Este resultado nos sugiere que probablemente la regulación de A viene dada por los procesos que ocurren a nivel de los cloroplastos más que en el control difusivo del CO₂ impuesto por los estomas, contrario a lo reportado en trabajos previos en los cuales hubo correlación entre A y g_s en clones de cacao cultivados *in situ* e invernadero (2,4,5,15,16).

Se realizaron medidas de PFs para determinar alguna relación con A que permita sugerir en que punto de la fase fotoquímica de la Fotosíntesis ocurre el control de la tasa de asimilación del CO₂.

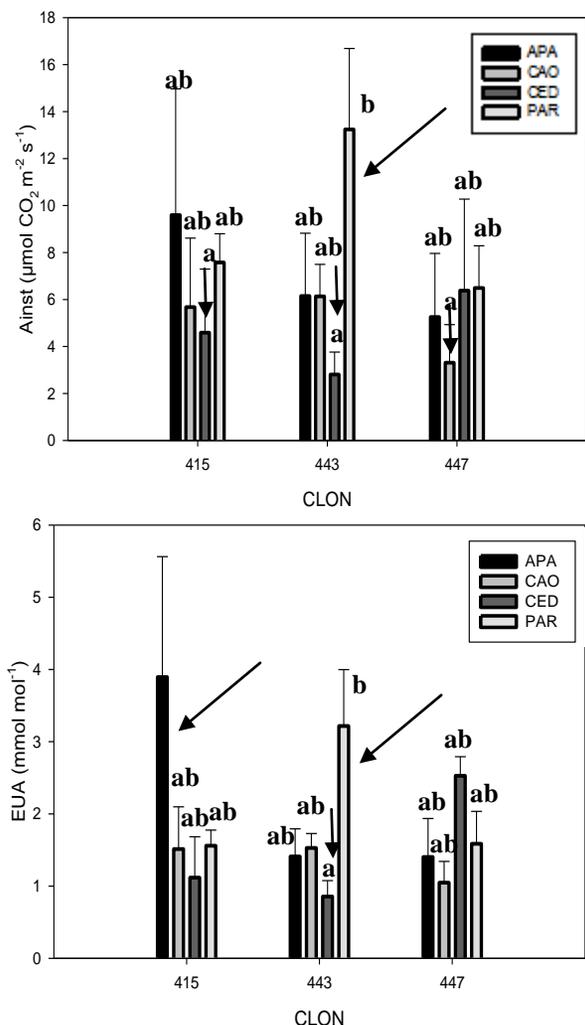


Fig. 1. Tasa de fotosíntesis y eficiencia de uso de agua en las 12 combinaciones clon-sombra. APA: *T. rosea*, CAO: *S. macrophylla*, CED: *C. odorata*, PAR: *C. thaisiana*. Las flechas largas señalan los valores más altos. La flecha pequeña señala los valores más bajos.

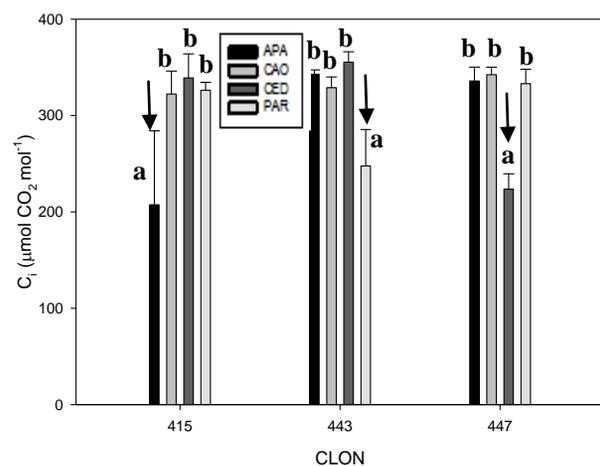


Fig. 2. Concentración intercelular de CO_2 en las 12 combinaciones clon-sombra. Las flechas señalan los menores valores de C_i .

Las 7 combinaciones clon-sombra evaluadas no tuvieron efectos estadísticamente significativos sobre los PFs (test post hoc de Tukey con $p > 0,05$).

Los valores de F_v/F_m fueron altos (0,77-0,82) descartando algún daño en el PSII (no ocurrió fotoinhibición). Los valores de Φ_{PSII} , q_P y q_{NP} fueron similares en las 7 parcelas para cada DFF (baja, media y alta), lo cual señala que la eficiencia del PSII, tanto en la canalización de energía radiante hacia la ionización de la P680, como en disipación de exceso de energía en forma de calor, no fue afectada por las diferentes combinaciones, sugiriendo que el control de A se da después de la transducción energética en la membrana de los tilacoides.

La ETR fue similar en todas las combinaciones para cada DFF. A alta DFF ($\sim 1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) se obtuvo una ETR promedio de $60,3 \mu\text{mol e}^- \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, valor relativamente bajo típico de plantas de sombra. Los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que el clon 443 bajo la sombra de PAR utiliza más eficientemente los e^- en la reducción del CO_2 , mientras que las otras combinaciones clon-sombra evaluadas, con bajas A, dedican una fracción importante de los e^- a otros sumideros (fotorrespiración, respiración diurna, reacciones de Mehler, reducción del nitrato, entre otros). Es necesario continuar con los estudios ecofisiológicos en este SA para obtener mayor información referente al efecto de la combinación clon-sombra sobre el desempeño fotosintético y la tolerancia a la sequía de los diferentes genotipos de cacao.

Conclusión

De las combinaciones estudiadas, el clon 443 bajo la sombra de PAR tiene el mejor desempeño fotosintético y alta EUA en las condiciones edafo-climáticas de la subregión Barlovento y puede ser una combinación promisoría considerando un futuro escenario de sequía más prolongada. Sin embargo, es necesario continuar con las evaluaciones ecofisiológicas e integrar estos resultados con estudios de productividad para determinar si existe correlación entre el desempeño fotosintético y producción de mazorcas y/o almendras. Con este estudio integral se estaría en capacidad de ofrecer una combinación clon-sombra realmente promisoría para esta zona agroecológica del país.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CDCH) de la UCV por el financiamiento de los proyectos de investigación: PG 03-7981-2011 y PSU 03-8846-2016-1. A la "Global Food Initiative" de la Universidad de

California y la Agencia de los Estados Unidos para el Desarrollo Internacional (USAID) por el financiamiento de la beca “Research and Innovation Fellowship for Agriculture”. Al Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), Estación Experimental Padrón, Tapipa, Edo. Miranda, por permitirnos gentilmente establecer el Sistema agroforestal y realizar nuestro estudio.

Referencias

1. Araque, O., Jaimez, R.E., Tezara, W., Coronel, I., Urich, R. y Espinoza, W. (2012). Comparative photosynthesis, water relations, growth and survival rates in juvenile criollo cacao cultivars (*Theobroma cacao*) during dry and wet seasons. **Experimental Agriculture**, **48**: 513–522
2. Ávila-Lovera, E., Coronel, I., Jaimez, R., Urich, R., Pereyra, G., Araque, O., Chacón, I. y Tezara, W. (2016). Ecophysiological traits of adult trees of Criollo cocoa cultivars (*Theobroma cacao* L.) from a germplasm bank in Venezuela. **Experimental Agriculture**, **52**(1): 137–153
3. Carr, M.k.V. y Lockwood, G. (2011). The water relations and irrigations requirements of cacao (*Theobroma cacao* L.): a review. **Experimental Agriculture**, **47**: 653–676.
4. De Almeida, J., Ávila-Lovera, E., Jaimez, R.E., Araque, O., Móvil, O., González, R. y Tezara, W. (2017). Características fotosintéticas de cuatro clones de cacao en un sistema agroforestal en Barlovento, Edo Miranda. **Investigación y Saberes**, **3**(3): 3-21. ISSN: 1390 – 8146.
5. De Almeida, J., Tezara, W. y Herrera, A. (2016). Physiological responses to drought and experimental water deficit and waterlogging of four clones of cacao (*Theobroma cacao* L.) selected for cultivation in Venezuela. **Agricultural Water Management**, **171**: 80-88.
6. Gornall, J., Betts, R., Burke, E., Clark, R., Camp, J., Willett, K. y Wiltshire, A. (2010). Implications of climate change for agricultural productivity in the early twenty-first century. **Philosophical Transactions of Royal Society**, **365**: 2973-2989.
7. Jaimez, R.E., Araque, O., Guzman, D., Mora, A., Azócar, C., Espinoza, W. y Tezara, W. (2013). Agroforestry systems of timber species and cacao: survival and growth during the early stages. **Journal of Agriculture and Rural Development in the Tropics and Subtropics**, **114**: 1–11.
8. Jaimez, R.E., Araque, O., Tezara, W. y Ely, F. (2014). Crecimiento y producción de cacaos criollos bajo la sombra de árboles maderables. **Comp. Fac. Agron. (LUZ)**: 7-10.
9. Jaimez, R.E., Araque, O., Tezara, W. y Ely, F. (2015). Ecofisiología de sistemas agroforestales: cacaos criollos con árboles maderables. **Área 1: Producción agropecuaria y forestal en los sistemas silvopastoriles y agroforestales. VIII Congreso internacional de sistemas agroforestales**: 93-97
10. Jaimez, R. E., Tezara, W., Coronel, I. y Urich, R. (2008). Ecofisiología del cacao (*Theobroma cacao*): su manejo en el sistema agroforestal. Sugerencias para su mejoramiento en Venezuela. **Revista Forestal Venezolana**, **52**(8): 253–258.
11. Li, Y., Ye, W., Wang, M. y Yan, X. (2009). Climate change and drought: a risk assessment of crop yield impact. **Climate Research**, **39**: 31-46.
12. López Tecpoyolt, G. (1993). Cap. 8: Sistemas agroforestales. **Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). Subsecretaría de Desarrollo rural. Dirección General de Apoyos para el Desarrollo rural.** Campus Puebla. México: 1-8.
13. Nair, P.K.R., Kumar, B.M. y Nair, V.D. (2009). Agroforestry as a strategy for carbon sequestration. **J. Plant Nutrition soil Science**, **172**: 10-23
14. Rada, F., Jaimez, R., García-Núñez, C. y Azócar, A. (2005). Relaciones hídricas e intercambio de gases en *Theobroma cacao* var. Guasare bajo períodos de sequía. **Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia**, **22**: 112–120
15. Tezara, W., De Almeida, J., Bolaños, M. y Reynel, V. (2017). Capacidad fotosintética del cacao: Ecuatorianos vs venezolanos. **3er Congreso Internacional de café y cacao**: 956-962. ISBN 978-959-7215-29-5.
16. Tezara, W., Urich, R., Jaimez, R., Coronel, I., Araque, O., Azócar, C. y Chacón, I. (2016). Does Criollo cocoa have the same ecophysiological characteristics as Forastero? **Botanical Sciences**, **94**(3): 563–574.
17. Tschardtke, T., Shonil, Y., Bhagwat, S., Buchori, D., Faust, H., Hertel, D., Ho" Ischer, D., Juhbandt, J., Kessler, M., Perfecto, I., Scherber, C., Schroth, G., Veldkamp, E. y Wanger, T.C. (2011). Multifunctional shade-tree management in tropical agroforestry landscapes – a review. **Journal of Applied Ecology**, **48**: 619-629.

Morfología y Anatomía Foliar. Aplicación e Importancia en Bromelias del Arboretum-IBE

MARCIA ESCALA Y LUIS HERMOSO

Laboratorio de Morfología y Anatomía Vegetal, Centro de Botánica Tropical, Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. Calle Suapure, Colinas de Bello Monte. Caracas - Venezuela. Correo: mescala2006@gmail.com

La presente investigación forma parte de las líneas de investigación que se vienen desarrollando en nuestro laboratorio desde hace varios años. Es nuestro interés realizar un estudio detallado de la hoja de los diferentes taxa de Bromeliaceae, para determinar caracteres de valor diagnóstico que permitan su mejor identificación y evaluar aquellos caracteres que puedan tener valor adaptativo para su mejor comprensión, establecimiento y mantenimiento. Las especies que hasta el momento hemos estudiado pertenecen principalmente a las subfamilias Bromelioideae y Tillandsioideae. Se han establecido hasta el momento patrones de tipificación y comparación entre los géneros y especies estudiadas, observando diferencias a nivel de subfamilia, género y especie. Las especies se distinguen por los siguientes caracteres morfológicos foliares: grosor, consistencia, coloración y presencia de espinas. Las Tillandsioideae estudiadas presentan un mesófilo compacto y homogéneo, mientras que en las Bromelioideae, éste consiste de epidermis, hipodermis mecánica, hipodermis acuífera, parénquima acuífero y parénquima clorofiliano. Se evidenciaron nuevos caracteres anatómicos con respecto a los ya evaluados que aportan elementos de juicio interesantes en la taxonomía y la ecología de la familia.

Introducción

La familia Bromeliaceae está conformada por 308 especies, agrupadas en 56 géneros, siendo la de mayor número de especies dentro de las angiospermas originarias del Neotrópico. Tradicionalmente ha sido dividida en tres subfamilias: Pitcairnioideae, Tillandsioideae y Bromelioideae.

Pitcairnioideae: Incluye principalmente plantas terrestres, sistema radical muy desarrollado, muchas de las cuales tienen márgenes de las hojas espinosos, consta de unos 16 géneros y cerca de 955 especies. Con ovario semisúpero a súpero, fruto tipo cápsula, semillas aladas, apendiculadas. Entre los géneros representativos están *Pitcairnia*, *Connellia*, *Lindmania*, *Dyckia*, *Navia* y *Brocchinia*.

Tillandsioideae: Epífitas. Tiene hojas enteras, sin espinas en el margen, incluye sólo 9 géneros, pero cerca de 1188 especies; el género más representado es *Tillandsia* con más de 500 especies. Ovario súpero, fruto tipo cápsula, semillas plumosas, epífitas. Entre los géneros están *Tillandsia*, *Vriesea*, *Glomeropitcairnia* y *Guzmania*.

Bromelioideae: Epífitas y terrestres, ovario ínfero, fruto tipo baya, semillas desnudas, sin apéndices, 31 géneros y 708 especies. Géneros representativos: *Bromelia*, *Aechmea*, *Billbergia*, *Ananas* y *Neoregelia*. Importancia Económica: Algunas especies de la familia son utilizadas con propósitos ornamentales y otras son de utilidad alimenticia, por su alto contenido en azúcares y vitaminas, o comercial, por la

utilización de sus fibras en la elaboración de cordeles, hamacas, redes, entre otros (1,4).

Tradicionalmente, la separación de Bromeliaceae en tres subfamilias se ha sostenido en el uso de distintos caracteres como tipo de margen de la hoja, posición del ovario, tipo de fruto y apéndices de la semilla (1,4). La anatomía foliar ha mostrado ser de utilidad taxonómica en numerosos grupos de angiospermas (3,4,5,6,7). La información que se ha generado para la familia Bromeliaceae está enfocada principalmente en el aspecto taxonómico, donde destacan las descripciones morfológicas y anatómicas, desarrollo de claves y en algunos casos el aspecto cariológico (2,3,4,6,7). Dentro de las Bromeliaceae, existen dos importantes trabajos en el aspecto anatómico. En el primero de ellos, Tomlinson (8) estudia especies de las tres subfamilias y encuentra que la epidermis expresa una alta especialización ecológica y posibles caracteres ocultos conservados que podrían expresar afinidades filéticas; además, el autor reconoce tres clases de estomas. Por otra parte, se evalúa la anatomía foliar de tres géneros de Pitcairnioideae: *Navia*, *Connellia* y *Cottendorfia* y en base a estos caracteres, elaboran claves para separar 102 especies de los géneros estudiados. Gracias al aporte extraordinario hecho por la Sociedad Venezolana de Bromeliología al IBE, desde hace varios años contamos con una colección de especies de Bromelias, las cuales, sumadas a las que crecen de manera natural en la Estación Experimental Arboretum del IBE, constituyen el objetivo principal estudio detallado de la hoja de los diferentes taxa de

Bromeliaceae, para determinar caracteres de valor diagnóstico que permitan su mejor identificación y evaluar aquellos caracteres que puedan tener valor adaptativo, para su mejor comprensión y mantenimiento.

Materiales y métodos

El área conocida como “Estación Experimental Arboretum IBE”, corresponde a un remanente de bosque seco premontano, decíduo, secundario, que cubre un área aproximada de 4 ha, situado en Colinas de Bello Monte, aproximadamente a 1200 msnm, al sureste de Caracas (municipio Baruta). El clima del Arboretum puede considerarse biestacional, con un periodo seco muy marcado, desde diciembre hasta mayo y otro húmedo, desde abril hasta noviembre; la precipitación anual promedio varía entre 550-1110 mm³ y la temperatura media entre 18-24°C.

El análisis anatómico se realizó en la zona media de la hoja y la preparación de los cortes se hizo mediante el método convencional para estudios morfoanatómicos. La morfología externa de la hoja, fue observada en un microscopio estereoscópico marca Zeiss KL1500, mientras que los cortes anatómicos fueron observados a través de un microscopio óptico marca Nikon 14 MLAB-2 y un microscopio óptico con luz polarizada marca Nikon OPTIPHOT; se tomaron fotografías en cada caso con una cámara digital (2,3).

Resultados y discusión

Bromelias registradas hasta el momento en el Arboretum-IBE:

Aechmea aquilega, *Aechmea fendleri*, *Aechmea blanchetiana*, *Aechmea ramosa*, *Aechmea orlandiana*, *Aechmea chantinii*, *Billbergia rosea*, *Bromelia pinguin*, *Canistrum* sp., *Neoregelia* sp., *Portea petropolitana*, *Quesnelia arvensis*, *Tillandsia anceps*, *Tillandsia balbisiana*, *Tillandsia flexuosa*, *Tillandsia recurvata*, *Tillandsia tenuifolia*, *Tillandsia usneoides*, *Tillandsia utriculata*, *Tillandsia variabilis*, *Vriesea alata*, *Wittrockia* sp.

Las 24 especies que hasta el momento hemos estudiado pertenecen principalmente a las subfamilias Bromelioideae y Tillandsioideae. En estudios previos hemos caracterizado los frutos y semillas de éstas y destacado tanto su valor diagnóstico como su importancia en la estrategia de disseminación y establecimiento de las mismas. (2). También hemos estudiado la importancia de la morfología y anatomía de la hoja, en los aspectos taxonómicos y ecológicos de este interesante grupo de plantas (3). Otra aplicación de interés en nuestro

laboratorio, se fundamenta en la caracterización morfoanatómica de la hoja de plantas de variedades y ecotipos de piñas amazónicas, obtenidas por cultivo *in vitro*, con base en esta tipología, se comparan éstas con las plantas donadoras de los explantes (plantas madre) y se determina si se producen variaciones en la estructura foliar de la población clonal, como consecuencia de las condiciones del cultivo *in vitro* (9). Las especies estudiadas hasta este momento en la presente investigación, se distinguen por los siguientes caracteres morfológicos foliares: grosor, consistencia, coloración y presencia de espinas. El patrón anatómico foliar es el típico de la familia Bromeliaceae, aunque se observan diferencias entre ellas. El mesófilo, con hipodermis mecánica en ambas caras, hipodermis acuífera, parénquima acuífero variable, en la cara adaxial y clorénquima en la abaxial. Los paquetes de fibras extravasculares y los canales de aerénquima, varían en número. Se establecen patrones de tipificación y comparación, entre ellas. Se reportan idioblastos que contienen cristales de oxalato de calcio, tipo rafidío, los cuales fueron encontrados en la hipodermis acuífera; dichos cristales pueden tener carácter diagnóstico para la familia Bromeliaceae (2,3). Entre los nuevos caracteres evaluados, observamos células epidérmicas con engrosamiento variable entre especies. Hojas hipoestomáticas excepto especies del género *Tillandsia* que son anfiestomáticas. Estomas hundidos o al nivel de las células epidérmicas. Tejido mecánico en Bromelioideae y ausente en Tillandsioideae. Hipodermis acuífera común en Bromelioideae, ausente en Tillandsioideae. Presencia de cristales de oxalato de calcio tipo estiloides, éstos no habían sido reportados con anterioridad en el grupo estudiado.



Aspecto general de *Aechmea* cf. *chantinii*, destacando la roseta tubuliforme.



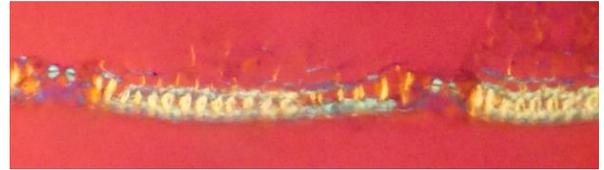
Morfología de las hojas variegadas de *Aechmea orlandiana*.



Aspecto general de *Tillandsia flexuosa*.



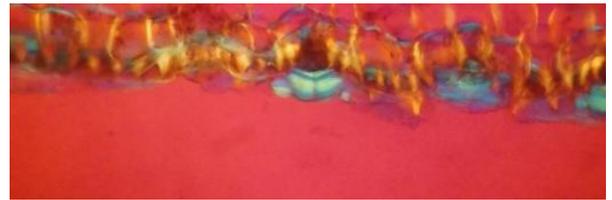
Morfología de las hojas bicoloradas de *Neoregelia* sp.



Estomas hundidos en *Aechmea orlandiana*.
Vistos con luz polarizada (LP).



Aspecto general de plantas de *Canistrum* sp. y *Neoregelia* sp.



Estomas sobresalientes en *Tillandsia* sp. LP.



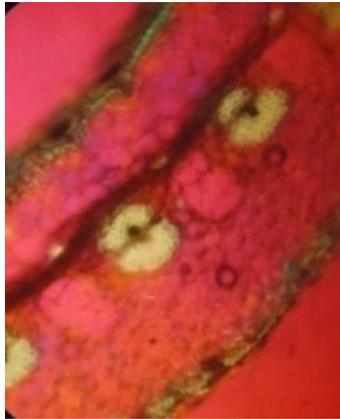
Haz vascular de *Aechmea caudata*, también se observa parénquima acuífero. Vistos con luz polarizada (LP).



Detalle de haz vascular, canales de aerénquima y cristales tipo estiloides. LP.



Corte transversal de hoja de *Tillandsia recurvata*. Se observan la escama asimétrica, los haces vasculares y el mesófilo homogéneo. LP.



Corte transversal de la hoja de *Tillandsia flexuosa*. Destacan epidermis, haces vasculares, canales aeríferos y mesófilo. LP.

Consideraciones finales

El patrón anatómico foliar es el típico de la familia Bromeliaceae, con diferencias a nivel de subfamilia, género y en algunos casos entre especies.

Entre los nuevos caracteres evaluados observamos células epidérmicas con engrosamiento variable entre especies. Hojas hipoestomáticas excepto especies del género *Tillandsia* que son anfiestomáticas. Estomas hundidos o al nivel de las células epidérmicas. Tejido mecánico en Bromelioideae y ausente en Tillandsioideae. Hipodermis acuífera común en Bromelioideae, ausente en Tillandsioideae. Presencia de cristales de oxalato de calcio tipo estiloides vistos en el grupo, por primera vez.

Referencias

1. **Benzing D.H.** (2000). **Bromeliaceae profile of an adaptive radiation.** Cambridge University Press, Cambridge. 708 p.

2. **Escala, M. y Hermoso, L.** (2014). Morfología y Anatomía de frutos y semillas. Aplicación e Importancia en Taxonomía y Biología de Dispersión. **Memorias del Instituto de Biología Experimental**, 7: 113-116
3. **Escala, M. y Hermoso, L.** (2016). Morfología y Anatomía Foliar. Aplicación e Importancia en Bromelias del Arboretum - IBE. **Memorias del Instituto de Biología Experimental**, 8: 145-148.
4. **Holst, B. y Vivas, Y.** (2008). Bromeliaceae. En: (Hokche, Huber y Berry eds.). **Nuevo catálogo de la flora de Venezuela.** 859 p.
5. **Metcalf, C. y Chalk, L.** (1950). **Anatomy of the Dicotyledons.** Vol II. 2nd. edition. Clarendon Press, Oxford.
6. **Proença, S. y Sajo, M.** (2007). Anatomía Foliar de Bromelias Ocorrentes em Áreas de Cerrado do Estado de São Paulo, Brasil. **Acta Bot. Bras.**, 21: 657-673.
7. **Smit, L.B. y Downs, R.J.** (1974). Pitcairnioideae (Bromeliaceae). **Fl. Neotrop. Monogr.**, 14(1): 1-658.
8. **Tomlinson, P.B y Metcalfe, E.** (1969). **Anatomy of the Monocotyledons.** 446 pp.
9. **Pineda, A., Vargas, T., Escala, M. y de García, E.** (2012). Organogénesis in vitro en piña "Española Roja" y morfoanatomía foliar de las plantas obtenidas en el proceso. **Bioagro**, 24(3): 175-186.

Biosistemática vegetal en la caracterización y preservación de la biodiversidad

MARÍA B. RAYMÚNDEZ^{1,3,4}, ANGIE SILVA^{1,3,4}, ALCIDES MONDRAGÓN^{1,2,4} Y REINA GONTO^{1,3}

¹Laboratorio de Biosistemática y Citogenética Vegetal, Centro de Botánica Tropical
Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela.

Apartado 47114, Caracas 1041A, Venezuela.

Correo: maria.raymundez@ciens.ucv.ve; angie.silva@ciens.ucv.ve

²Universidad Centro-Occidental Lisandro Alvarado, Decanato de Agronomía.

Correo: alcidesmondragon@ucla.edu.ve

³Escuela de Biología, Facultad de Ciencias, UCV. Correo: rgonto@gmail.com

⁴Postgrado en Ciencias, mención Botánica, Facultad de Ciencias, UCV.

La Biosistemática se basa en la integración de diferentes fuentes de evidencia a fin de interpretar procesos evolutivos que resultan de utilidad para caracterizar grupos vegetales, y sobre todo, como fuente de información básica para ayudar en el desarrollo de planes de conservación y manejo adecuado de nuestra biodiversidad, o bien en su uso racional en la biotecnología o la industria. En este sentido, se presenta el estado de avance de cuatro proyectos de investigación directamente relacionados con la caracterización de la flora venezolana en distintas regiones del país, bien sea con fines ulteriores de conservación, como son los estudios en poblaciones simpátricas de las especies de mangle rojo (*Rhizophora* L.) presentes en el oriente de país, el estudio florístico y ecoanatómico en la sierra de Baragua, en el municipio Urdaneta, al noroccidente del estado Lara, y la revisión del género *Carex* para Venezuela; o bien, como aporte en la caracterización de almidones procedentes de cereales, leguminosas, frutos, semillas y tubérculos que crecen en nuestro país, a fin de caracterizarlos y explorar su potencial de utilización, bien en su forma nativa o modificada, en la industria de los alimentos, del papel, petrolera, textil, cosmética, de imprenta, etc.

Introducción

La Biosistemática se vale de la integración de diferentes fuentes de evidencia que van desde el nivel macro a lo micro, partiendo desde la más tradicional que es la morfológica, pasando por la anatomía, hacia la citogenética, bioquímica y biología molecular, pudiendo integrar también con ellas evidencias biogeográficas y ecológicas a fin de interpretar procesos evolutivos que son de utilidad para caracterizar grupos vegetales, y sobre todo, como fuente de información básica de apoyo en el desarrollo de planes de preservación y manejo adecuado de nuestra biodiversidad. En este sentido, se presenta a continuación el estado de avance de cuatro proyectos de investigación relacionados directamente con la caracterización de la flora venezolana presente en distintas regiones del país.

Caracterización anatómica foliar, citogenética y molecular del complejo mangle rojo (*Rhizophora* L.) en el oriente de Venezuela, con fines biosistemáticos

De las seis especies de mangle reportadas en Venezuela, el género *Rhizophora* es el más complejo taxonómicamente, debido a que las tres especies que lo conforman son morfológicamente similares y se distribuyen frecuentemente de forma simpátrica, siendo *R. x harrisonii* descrita como un híbrido entre

R. mangle y *R. racemosa* (2,5). Empleando marcadores moleculares, Cerón-Sousa *et al.* (4) reportan que hay hibridación e introgresión entre estas tres entidades; así mismo, también detectan una fuerte señal filogeográfica asociada a los océanos Atlántico y Pacífico y se concluye que las poblaciones de cada vertiente deben ser más estudiadas, así como su relación con otras poblaciones del mundo, y que además deben ser revisadas las relaciones sistemáticas actuales dentro del género. Como consecuencia, el objetivo general de este estudio es caracterizar a nivel intra e inter-específico el complejo mangle rojo (*R. mangle*, *R. x harrisonii* y *R. racemosa*) a través del estudio anatómico foliar, embriológico, citogenético y molecular de poblaciones simpátricas ubicadas en una localidad atlántica y localidades caribeñas de la región oriental de Venezuela, con fines biosistemáticos. La metodología incluye un estudio anatómico del nervio medio, mesófilo, epidermis y pecíolo foliar; un estudio embriológico y citogenético gametofítico y un estudio molecular empleando microsátélites, ADN nuclear y cloroplástico de las tres entidades taxonómicamente reconocidas.

Los resultados preliminares del estudio anatómico foliar muestran que la hoja de las tres especies es glabra, dorsiventral e hipostomática. La presencia de esclereidas de forma y tamaño variable es común en

las tres especies, así como los tipos que se presentan (astroesclereidas, osteoesclereidas, braquiesclereidas y esclereidas con forma de H características del género). Su disposición parece seguir un patrón aleatorio, dispuestas vertical u horizontalmente en el mesófilo y nervio medio, por lo que muestran un patrón de distribución difuso. No se reportan diferencias cualitativas entre las especies de *Rhizophora* examinadas en relación a su anatomía, pero se observó que hay variación en el número de estratos que constituyen la hipodermis, número de capas del parénquima esponjoso y empalizada, número de capas de aerénquima y colénquima y número de haces vasculares en el nervio medio.

Con respecto a la caracterización embriológica, se observaron diferencias en el tipo de dehiscencia de la antera en las tres especies, un patrón de desarrollo de la antera de tipo básico, un tapete uniestrato de tipo secretor, así como un endotecio también uniestrato; las tétradas presentan forma tetraédrica y se observó que la forma de los granos de polen en *R. racemosa* y *R. x harrisonii* es subprolata, mientras que en *R. mangle* es alargada-esferoidal y subtriangular.

Con respecto a la caracterización molecular, el análisis de seis microsátelites registró 37 alelos diferentes en los 162 individuos de *Rhizophora* examinados, de los cuales 17 fueron compartidos entre el Atlántico y el mar Caribe, 15 alelos fueron exclusivos de las poblaciones de *Rhizophora* del Caribe y 5 fueron exclusivos de las poblaciones del Atlántico. En la actualidad se evalúa la diversidad y diferenciación genética a nivel inter e intra-específico de las especies de *Rhizophora* examinadas, considerando diferentes niveles de información (entre especies, entre vertientes y entre poblaciones), para lograr una mejor comprensión de la dinámica evolutiva del género en Venezuela y aportar evidencias para su caracterización biosistemática.

Composición florística, estructura, ecoanatomía e influencia de la herbivoría en dos bosques secos premontanos de la sierra de Baragua, edo. Lara, Venezuela

Con la finalidad de comparar la composición, estructura y diversidad florística de las localidades El Ralo y Villa Rosa de la sierra de Baragua, municipio Urdaneta del estado Lara, se realizaron exploraciones botánicas entre marzo de 2011 y diciembre de 2014, dado que las investigaciones sobre florística en dicho municipio son escasas, aunque durante la década de los 90 se realizaron levantamientos florísticos con poca información sobre la vegetación de la zona (21,23). Más recientemente, Mondragón *et al.* (14), colectaron el primer helecho (*Cheilanthes microphylla*, Pteridaceae) en Baragua, mientras que

Mondragón y Alvarado (13) registraron 118 especies en un listado preliminar de varias localidades del municipio Urdaneta.

La importancia de realizar inventarios florísticos y la clasificación de la alta biodiversidad de los bosques de Venezuela ha sido resaltada por Huber (11). Aymard (1) también ha recomendado incrementar las exploraciones botánicas y estudios de la composición florística y estructura de los bosques con la finalidad de obtener mayor información y así poder relacionar mejor su flora con otras áreas de interés científico. Sin embargo, a pesar de los esfuerzos, aún grandes zonas de importancia ecológica del país carecen de inventarios florísticos y, usualmente, al realizar nuevas exploraciones en ellas se encuentran plantas desconocidas. En este sentido, en el presente trabajo se reportan por primera vez diversas especies para el municipio Urdaneta del estado Lara, ampliándose la distribución altitudinal de algunas de ellas y enriqueciendo el conocimiento sobre la flora regional de esta entidad.

En las localidades exploradas, siguiendo el procedimiento tradicional de herborización y haciendo uso de transectos, se colectaron 14 nuevos reportes de Magnoliophyta para el estado Lara, de los cuales ocho son árboles y seis arbustos. Los géneros encontrados entre las especies arbustivas son *Calypttranthes*, *Casearia*, *Myrcianthes*, *Myrciaria*, *Plinia* y *Sideroxylon*, y entre las arbóreas se encuentran *Coccoloba*, *Ficus*, *Helietta*, *Pouteria*, *Pseudopiptadenia*, *Sapindus*, *Syagrus* y *Zanthoxylum*. La composición florística a nivel de los géneros encontrados en la sierra de Baragua es congruente con los datos reportados por Smith y Cadena (20) para las zonas áridas y semiáridas del estado Lara, así como con los obtenidos por diversos autores de inventarios florísticos realizados en otras zonas secas de Venezuela (3,6,8,12,16,19,21,22) y en otros bosques secos del Neotrópico (7). Esta situación es de esperarse, ya que en estas regiones las condiciones climáticas, las comunidades vegetales y el paisaje son similares (9).

De entre las especies halladas en el municipio Urdaneta que son reportadas por primera vez para el estado Lara, once de ellas también se encuentran presentes en el estado Falcón; éstas son *Casearia acuminata*, *Calypttranthes multiflora*, *Ceroxylon vogelianum*, *Ficus pertusa*, *Helietta plaeana*, *Myrciaria floribunda*, *Pouteria glomerata*, *Pseudopiptadenia pittieri*, *Sapindus saponaria*, *Sideroxylon obtusifolium*, y *Zanthoxylum culantrillo*. La probabilidad de encontrar estas especies compartidas entre Lara y Falcón se le podría atribuir a la proximidad entre ambas zonas; sin embargo, a pesar de que en su zona limítrofe ambas entidades

comparten un mismo régimen climático y se encuentran relativamente cerca, otros factores podrían influir en la distribución de la vegetación; en este caso, tal como lo señaló González (9), el elemento edáfico podría ser una variable determinante en las variaciones florísticas y estructurales de la composición de los bosques secos que se encuentren relativamente cercanos entre sí.

De los 14 nuevos reportes para el estado Lara, ocho son nuevos registros altitudinales, siete sobre el límite y uno por debajo de la distribución conocida, de acuerdo al Nuevo Catálogo de la Flora Vascular de Venezuela (10); el resto de las especies se encontraron dentro de los rangos señalados. Estos nuevos registros altitudinales permiten corroborar la importancia de los inventarios florísticos, tal como lo mencionan Roalson y Allered (18), quienes señalan que es necesario conocer la riqueza florística de la vegetación original mediante estudios de inventarios florísticos detallados, ya que estos son la base fundamental para la realización de estudios más precisos sobre ecología y biogeografía, así como también son indispensables para la creación de políticas para la conservación y el manejo de los recursos naturales.

Para Rivera y Espinosa (17), la importancia que tienen las floras locales dentro del estudio de la floras regionales, aun cuando la zona haya sido previamente explorada, es que es posible descubrir especies que no habían sido reportadas con anterioridad para la zona, evidenciándose que aunque la flora de una región ya se encuentre publicada, la continuación de las exploraciones botánicas resulta importante para aumentar el conocimiento sobre ella, y de este modo, contar con un mayor número de herramientas a la hora de tomar decisiones en cuanto a la conservación de recursos naturales.

Revisión taxonómica del género Carex L. en Venezuela

Como parte de la revisión taxonómica de las especies del género *Carex* L. que crecen en Venezuela, se vienen realizando diferentes actividades teórico prácticas comunes en los estudios taxonómicos de plantas. Éstas incluyen la revisión y análisis de la literatura existente, confección de una base de datos relacional con la data de herbarios venezolanos y algunos en el extranjero, colecciones de campo en diversas regiones de Venezuela, disección y toma de medidas bajo lupa, así como toma de fotografías y elaboración dibujos del hábito y órganos de las plantas estudiadas. A partir del desarrollo de las actividades anteriores se ha ido construyendo una tabla de caracteres con los cuales complementar las descripciones originales de las especies con base en

los datos morfológicos obtenidos de los especímenes venezolanos.

Se han revisado hasta ahora unas 800 exsiccatae en 16 herbarios nacionales, y la colección en campo asciende a 147 especímenes del género. La revisión detallada de este material nos lleva a reportar hasta el momento la existencia de 44 especies del género en el país, 16 más que las señaladas en el Nuevo Catálogo de la Flora Vascular de Venezuela (10), pudiendo ser agrupadas en 7 secciones, y entre las cuales se tiene la presunción de la existencia de una nueva especie proveniente de los páramos del estado Trujillo. Se trata de una colección propia y actualmente se está estudiando al detalle para verificarlo. Se ha preparado también una clave para las secciones de *Carex* presentes en Venezuela y se han adelantado claves taxonómicas preliminares con las cuales identificar algunas de las especies pertenecientes a cada una de dichas secciones.

Asimismo, se viene diagramando un mapa de distribución de las especies del género en Venezuela y se han realizando dibujos del hábito y detalles diagnósticos de hojas, inflorescencias, espigas y aquenios de más o menos la mitad de las especies.

Caracterización física de almidones nativos y modificados utilizando microscopía de luz polarizada

De entre los carbohidratos de cadena larga de origen biológico, el almidón es uno de los que posee más versatilidad, pudiendo ser explotadas sus cualidades poliméricas no sólo desde el punto de vista nutricional, debido a sus propiedades funcionales, sino en muy diversas industrias de manufactura como la del papel, los plásticos, la petrolera, la cosmética, la imprenta, etc. El uso potencial de dichos almidones viene dado por sus características físicas y químicas, tanto en estado nativo como si éstos han sido modificados mediante procesos químicos o físicos. Dichas características pueden ser descritas en detalle analizando los granos de almidón bajo un microscopio de luz polarizada, sacando partido de la birrefringencia que les otorga la cualidad cristalina de estos biopolímeros.

En colaboración con el equipo dirigido por la Dra. Elevina Pérez (ICTA-UCV), se vienen evaluando almidones procedentes de muy diversas fuentes botánicas. Entre los materiales más recientemente evaluados se encuentra el almidón del “ñame congo” (*Dioscorea bulbifera* L.), tubérculo introducido de uso común en gran parte del país, al que también se le conoce bajo los nombres de “ñame de mata”, “ñame criollo” y “papa aérea”. Las características físico-químicas del almidón de dicha especie, reveladas a través de su estudio óptico y granulométrico, indican

que se trata de un material con potencial de uso por distintos tipos de industria (15).

Referencias

1. **Aymard, G.** (2011). Bosques húmedos macrotérmicos de Venezuela. **BioLlania Ed. Esp.**, **10**: 33-46.
2. **Breteler, F.** (1969). The Atlantic species of *Rhizophora*. **Acta. Bot. Neerl.**, **18**: 434-441.
3. **Calzadilla, J. y Lárez, A.** (2008). Flora y vegetación de la cuenca alta del río Aragua, municipio Piar, estado Monagas, Venezuela. **Acta Bot. Venez.**, **31**(1): 251.
4. **Cerón-Souza, I., Rivera-Ocasio, E., Medina, E., Jimenez, J., McMillan, W. y Bermingham, E.** (2010). Hybridization and introgression in New World red mangroves, *Rhizophora* (Rhizophoraceae). **Am. J. Bot.**, **97**: 945-957.
5. **Cornejo, X.** (2013). Lectotypification and a new status for *Rhizophora x harrisonii* (Rhizophoraceae), a natural hybrid between *R. mangle* and *R. racemosa*. **Harvard Papers in Botany**, **18**(1): 37.
6. **Dezseo, N., Flores, S., Zambrano, S., Rodgers, L. y Ochoa, E.** (2008). Estructura y composición florística de bosques secos y sabanas en los llanos orientales del Orinoco, Venezuela. **Interciencia**, **33**: 733-740.
7. **Gentry, A.** (1995). Diversity and floristic composition of neotropical dry forests. En: Bullock, S.; Mooney, H. y Medina, E. (eds.): **Seasonally dry tropical forests**. Cambridge University Press: 146-194.
8. **González, E.** (1980). Estudio preliminar de la vegetación del bosque xerófilo de la región de Las Peonías (estado Zulia, Venezuela). **Bol. Centro Invest. Biol.**, **14**: 83-99.
9. **González, V.** (2013). **La vegetación de Venezuela al norte del río Orinoco**. Fundación Instituto Botánico de Venezuela Dr. Tobías Lasser. Caracas, Venezuela, 196 p.
10. **Hokche, O., Berry, P. y Huber, O.** (2008). **Nuevo catálogo de la flora vascular de Venezuela**. Fundación Instituto Botánico de Venezuela Dr. Tobías Lasser. Caracas, Venezuela, 859 p.
11. **Huber, O.** (1996). Los problemas vinculados con la clasificación de la vegetación. **Cuadernos de Agronomía**, **7**: 15-32.
12. **Matteucci, S.** (1986). Las zonas áridas y semiáridas de Venezuela. **Zonas Áridas**, **4**: 39-48.
13. **Mondragón, A. y Alvarado, H.** (2015). Listado florístico preliminar de la sierra de Baragua, municipio Urdaneta, estado Lara, Venezuela. **Pittieria**, **39**: 91-106.
14. **Mondragón, A., Alvarado, H. y Vásquez, C.** (2014). Primer reporte de *Cheilanthes microphylla* (Sw.) Sw. (Pteridaceae) para el estado Lara, Venezuela. **Bioagro**, **26**(3): 183-187.
15. **Pérez, E., Ciarfella, A. y Raymúndez, M.B.** (2016). Identification by optical and electronic microscopy and laser diffraction of the starch isolated from ñame congo (*Dioscorea bulbifera* L.). **Acta Microscopica**, **25**(1): 16-20.
16. **Rico, R., Rodríguez, L., Pérez, R. y Valero, A.** (1996). Mapa y análisis de la vegetación xerófila de las lagunas de Caparú, cuenca media del río Chama, estado Mérida. **Plántula**, **1**: 83-94.
17. **Rivera, J. y Espinosa, A.** (2011). Nueva información sobre registros recientes de las familias Meliaceae, Poaceae y Viscaceae en la flora fanerogámica del Distrito Federal, México. **UDO Agrícola**, **11**(1): 83-88.
18. **Roalson, E. y Allered, K.** (1998). A floristic study in the Diamond Creek drainage area, Gila National Forest, New México. **Aliso**, **17**: 47-62.
19. **Smith, R.** (1975). Ecología de las plantas leñosas del espinar de los estados Lara y Falcón de Venezuela y clave ilustrada en base a sus características vegetativas. **Acta Bot. Venez.**, **10**: 87-129.
20. **Smith, R. y Cadena, A.** (1991). Dinámica de un bosque seco de Pico Pico, y otro húmedo, en la Fila de Los Naranjos, en Ecología del estado Lara. **BioLlania Ed. Esp.**, **1**: 178-191.
21. **Vásquez, E. y Pérez, M.** (1994). **Levantamiento de información básica de la vegetación de la serranía de Baragua**. Ministerio del Ambiente y de los Recursos Naturales Renovables. Lara, Venezuela, 89 p.
22. **Vera, A., Martínez, M., Ayala, Y., Montes, S. y González, A.** (2009). Florística y fisionomía de un matorral xerófilo espinoso intervenido en Punta de Piedras, municipio Miranda, estado Zulia, Venezuela. **Rev. Biol. Trop.**, **57**(1- 2): 271-281.
23. **Virgüez, G. y Smith, R.** (1991). Fisiografía, vegetación y uso del valle árido de Baragua, edo. Lara. **BioLlania Ed. Espec. No. 1, Cap. III**.

Estudio de la arboricultura urbana perteneciente a la parroquia El Recreo, Municipio Libertador (Distrito Capital)

ANIBAL CASTILLO SUAREZ¹ Y REINA BELANDRIA¹

¹Laboratorio de Traqueofitas y Atraqueofitas, Centro de Botánica Tropical, Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela

Calle Suapure, Colinas de Bello Monte. Caracas-Venezuela. Correo: anibalcastillo.ibe@gmail.com

La presente investigación forma parte del proyecto de la arboricultura urbana perteneciente a diez parroquias del Valle de Caracas (Municipio Libertador). El objetivo de esta investigación fue: realizar el inventario florístico de las especies de árboles que se encuentran en las diferentes calles, avenidas y plazas de esta parroquia. Se realizaron 15 salidas de campo abarcando todas sus urbanizaciones. Para cada uno de los individuos y con la ayuda de una planilla de observaciones de campo, se registraron datos sobre: tamaño, diámetro, copa, follaje, sistema radical, longevidad y valor ornamental. Se prepararon colecciones botánicas de las especies y fueron identificadas taxonómicamente a nivel de familia, género y especie, con sus nombres científicos. Se inventariaron 4535 individuos arbóreos, distribuidos en 47 familias, 81 géneros y 100 especies. Las familias con mayor número de especies resultaron ser las siguientes: Cesalpiniaceae, Myrtaceae, Moraceae, Fabaceae, Mimosaceae, Meliaceae, Bignoniaceae y Euphorbiaceae. Por otra parte, se evaluó el origen geográfico, las especies más comunes, diámetro, valor ornamental, la condición fitosanitaria y condición de riesgo de las especies.

Introducción

La calidad de vida de una zona urbana depende de gran parte de la cantidad y mantenimiento de las especies verdes existentes, tanto dentro de ellas como en sus proximidades como: parques, plazas, avenidas, calles, jardines y bosques suburbanos. Por consiguiente, la importancia de las áreas verdes en la ciudad tiene efectos altamente beneficiosos para la salud de sus pobladores (2,18). La arboricultura urbana la podemos definir como la ordenación de los árboles en las zonas urbanas de acuerdo a las características del medio ambiente y a las necesidades de sus habitantes. El manejo de los árboles en una ciudad trae como consecuencia el mejoramiento del clima de las ciudades, así como la regulación de la contaminación atmosférica y sónica, creando microclimas que controlan la velocidad del viento, la humedad y la fuerte insolación de las ciudades tropicales (2,5,11,18). Los árboles, debido a su gran tamaño (porte), ramificación de la copa, follaje, color de flores y de los frutos, asociado a los cambios climáticos e importancia paisajística, son la expresión más representativa y apreciada de la arboricultura urbana (1,2,15,18). A pesar de la gran variedad de especies arbóreas plantadas en la ciudad de Caracas, éstas adolecen de un estudio previo, técnico y científico de planificación de las zonas verdes, por parte de los organismos del estado responsables de la siembra y mantenimiento de los árboles. Cuando recorremos nuestras principales calles y avenidas, observamos árboles mal plantados, debido a la mala escogencia y selección de las especies utilizadas en

las labores de reforestación (5,6,7,8,9,15,18). La flora dendrológica venezolana es una de la más ricas del mundo, con aproximadamente 5000 especies de árboles distribuidos en las diferentes zonas boscosas del país (3). Desde el punto de vista ornamental, existe una abundante y excelente bibliografía sobre los árboles ornamentales y frutales del país (1,11,12,13,14,15,16). En esta publicación, se actualiza la arboricultura urbana de la parroquia El Recreo, con la realización del inventario de los árboles, a fin de estimar exactamente cuántos árboles existen, identificar taxonómicamente sus especies, determinar su estado de salubridad y contribuir de esta manera con los servicios fitosanitarios que ofrecen los organismos del Estado. En tal sentido, se deberían eliminar los árboles muertos y secos, sanar los enfermos con la eliminación de las ramas secas, ramas atacadas con tiñas y guatepajaritos, con la utilización de técnicas de poda y planificación de futuras siembras con nuevos individuos apropiados a las condiciones ambientales del presente.

Metodología

Área de estudio

La parroquia El Recreo presenta un área aproximada de 18,1 km², estando conformada por las siguientes urbanizaciones: San Antonio, Bello Monte, Sabana Grande, Las Delicias, La Campiña, Los Jabillos, Los Cedros, La Florida, Quebrada Honda, Maripérez, Los Caobos, Plaza Venezuela, Guaicaipuro, Santa Rosa, La Colina, Las Palmas, Chapellín y Alta Florida (**Fig. 1**).

frutos comestibles reportamos a: *Mangifera indica* (mango), *Spondias mombin* (jobo), *Tamarindus indica* (tamarindo), *Licania pyrifolia* (merecure), *Mammea americana* (mamey), *Persea americana* (aguacate), *Psidium guajava* (guayaba), *Citrus limon* (limón), *Melicoccus bijugatus* (mamón) y *Manilkara sapota* (níspero). El porte o tamaño de los arboles es otro carácter importante en la ornamentación de la ciudad. En este estudio reportamos 23 especies de árboles con tamaños entre 20 y 30 metros de alto (23%). Considerando el carácter copa, encontramos 17 especies (17%) con copas medianas anchamente extendidas. Otros atributos de los arboles de valor ornamental son el follaje y la corteza, donde se reportaron 8 especies (8%) de árboles siempre verdes con follaje denso a muy denso y 7 especies (7%) con cortezas con escultraciones, fisuradas, desprendiéndose en placa o con colores llamativos.

Condición fitosanitaria

En relación al estado fitosanitario, reportamos 2714 árboles sin ataque de plagas (59,8%) y 1821 individuos atacados por plagas (40,2%). Las plagas más frecuentes son la tiña (*Tillandsia recurvata*) y los guatepajaritos que corresponden a especies de plantas semiparásitas pertenecientes a las familias Loranthaceae y Viscaceae. La información registrada en campo mostró 2965 individuos (65,4%) sin la presencia de tiña y 1570 individuos (34,6%) atacados por tiña. Con respecto al ataque de guatepajaritos, se reportaron 359 individuos (7,9%) con guatepajaritos y 4176 individuos (92,1%) sin la presencia de guatepajaritos. Las especies que comúnmente son atacadas por plagas son las siguientes: *Spathodea campanulata* (Gallito), *Tabebuia rosea* (Apamate), *Cassia siamea* (Casia de Siam), *Lagerstroemia speciosa* (Flor de la Reina), *Swietenia macrophylla* (Caoba) y *Melaleuca linariifolia* (Melaleuco) (Tabla 2).

Tabla 2. Condición fitosanitaria.

ATRIBUTOS	FRECUENCIA	PORCENTAJE (%)	PLAGAS
Sin tiña	2965	65,4	-
Con tiña	1570	34,6	<i>Tillandsia recurvata</i>
Sin guatepajarito	4176	92,1	-
Con guatepajarito	359	7,9	Especies de Loranthaceae y Viscaceae
Sin plagas	2714	59,8	-
Con plagas	1821	40,2	-

Condición de riesgo

De los 4535 individuos censados, 3949 individuos (87,1%) no ocasionan ningún riesgo y solamente 586 (12,9%) presentan condición de riesgo. Entre las principales condiciones de riesgo reportamos: 410 individuos (9%) levantando aceras, 77 árboles muertos (1,7%), 25 individuos (0,6%) sobre tanquillas eléctricas, gas, hidráulicas y telefónicas, 10 individuos (0,2 %) en contacto con edificaciones y 64 individuos (1,4%) sobre postes, semáforos y tendidos eléctricos (Tabla 3).

Tabla 3. Condición de riesgo.

ATRIBUTOS DE RIESGO	FRECUENCIA	PORCENTAJE (%)
Sin riesgo	3949	87,1
Con riesgo	586	12,9
Levantando acera	410	9
En contacto con edificios	10	0,2
Sobre tanquillas	25	0,6
Sobre postes, semáforos y tendidos eléctricos	64	1,4
Árboles muertos	77	1,7
Total	4535	100

Agradecimientos

Al Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología (FONACIT) por financiar esta investigación (proyecto PEII N° 20110011080). Al T.S.U Ángel Bravo por la elaboración de la base de datos.

Referencias

1. **Aristeguieta, L.** (1962). **Árboles ornamentales de Caracas.** Universidad Central de Venezuela. Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico. UCV, 218 p.
2. **Aristeguieta, L.** (1973). **Los Árboles y las alteraciones del medio ambiente de Caracas.** Editorial Sucre, 23 p.
3. **Aristeguieta, L.** (2003). **Estudios dendrológicos de la flora de Venezuela.** Academias de Ciencias Físicas, Matemáticas y Naturales. Volumen 38. 571 p.
4. **Badillo, V., Schnee, L. y Benítez, C.E.** (1985) **Clave de las familias de plantas superiores de Venezuela.** Espande, S.R.L. (edit), 270 p.
5. **Castillo, A., Belandria, R., Durán, W. y Gutiérrez, M.** (2013a). Estudios de la arboricultura urbana perteneciente a la parroquia San Pedro, Municipio Libertador (Distrito

- Capital). **Rev. Observador del Conocimiento**, 1(1): 116-121.
6. **Castillo, A., Belandria, R., Gutiérrez, M. y Durán, W.** (2013b). Catálogo dendrológico de las especies reportadas en el estudio de la arboricultura urbana realizado en la parroquia San Pedro. Municipio Libertador. **Segundo Congreso Venezolano de Ciencia, Tecnología e Innovación**. Caracas.
 7. **Castillo, A., Belandria, R., Gutiérrez, M. y Durán, W.** (2013c). Estudio de la arboricultura urbana perteneciente a la parroquia El Recreo. Municipio Libertador. Distrito Capital. **Segundo Congreso Venezolano de Ciencia, Tecnología e Innovación**. Caracas.
 8. **Castillo, A., Belandria, R., Durán, W. y Gutiérrez, M.** (2014). Estudio de la arboricultura urbana perteneciente a la parroquia San Pedro. Municipio Libertador (Distrito Capital). **MIBE**, 7: 193-196.
 9. **Castillo, A., Belandria, R., Gutiérrez, M. y Durán, W.** (2018). Catálogo dendrológico de la arboricultura urbana realizado en la parroquia El Recreo. Municipio Libertador. **Jornadas de Investigación y Extensión**. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela. Caracas Venezuela.
 10. **Hokche, O., Berry, P. y Huber, O.** (2008). **Nuevo catálogo de la flora vascular de Venezuela**. Fundación Instituto Botánico de Venezuela "Dr. Tobias Lasser". Caracas, 859 p.
 11. **Hoyos, J.** (1985). **Flora emblemática de Venezuela**. Caracas, 213 p.
 12. **Hoyos, J.** (1990). **Los árboles de Caracas**. Sociedad de Ciencias Naturales La Salle. Monografía N° 24. Caracas, 409 p.
 13. **Hoyos, J.** (1992). **Árboles Tropicales Ornamentales**. Sociedad de Ciencias Naturales La Salle. Monografía N° 38. Caracas, 272 p.
 14. **Hoyos, J.** (1994). **Árboles frutales de Venezuela**. Sociedad de Ciencias Naturales La Salle. Monografía N° 36. Caracas, 384 p.
 15. **Hoyos, J.** (2006). **Arboricultura Urbana**. Sociedad de Ciencias Naturales La Salle. Monografía N° 50. Caracas, 195 p.
 16. **Hoyos, J.** (2009). **Guía de árboles de Venezuela**. Sociedad de Ciencias Naturales La Salle. Monografía N° 32. Caracas, 350 p.
 17. **Lasser, T.** (1965). **Las familias de Traqueofitas de Venezuela**. Editorial Universitaria de Oriente. Cumaná, 186 p.
 18. **Merola, G.** (1993). **Vegetación y diseño**. Fundación Instituto Botánico de Venezuela, 119 p.

Ficoflora de macroalgas bénticas marinas venezolanas. Estatus actual

SANTIAGO GÓMEZ ACEVEDO¹ Y YUSNEYI CARBALLO BARRERA²

¹Laboratorio de Traqueophyta y Atraqueophyta, Centro de Botánica Tropical

²Centro de Enseñanza Asistida por Computador, Escuela de Computación, Facultad de Ciencias
Universidad Central de Venezuela. Correo: santiago.gomez@ciens.ucv.ve / yusneyi.carballo@ciens.ucv.ve

El Laboratorio de Traqueophyta y Atraqueophyta del Instituto de Biología Experimental (LTA-IBE) de la Universidad Central de Venezuela, ha venido desarrollando estudios sobre la ficoflora venezolana desde hace aproximadamente 35 años. En el presente trabajo, se divide esa actividad en dos períodos: el primero, caracterizado por el desarrollo de proyectos cuyos objetivos persiguieron el estudio de áreas de la costa venezolana anteriormente inexploradas, realizando valiosos aportes a la ficoflora. En este período se conformó una base de datos cuya publicación marca los objetivos del segundo período, con el lanzamiento de dos sitios web: Ficoflora del Parque Nacional Archipiélago Los Roques y Ficoflora Venezuela. Este último sitio ha sido visitado desde distintos países del mundo, lo cual ha permitido darle mayor visibilidad a la diversidad florística de algas bénticas marinas de Venezuela. Adicionalmente, el manejo de los datos recopilados mediante herramientas estadísticas adecuadas permitirá aportar datos sobre la relación entre la distribución de los elementos florísticos y los parámetros ambientales característicos de la costa venezolana.

Introducción

El Laboratorio de Traqueophyta y Atraqueophyta del Instituto de Biología Experimental (LTA-IBE) de la Universidad Central de Venezuela, ha venido desarrollando estudios sobre la ficoflora venezolana desde hace aproximadamente 35 años. Estos resultados están reflejados en distintas presentaciones en eventos científicos, publicaciones en revistas arbitradas, trabajos académicos, trabajos especiales de grado, tesis doctorales, informes técnicos de proyectos y han sido recogidos en las distintas emisiones de las Memorias del Instituto de Biología Experimental. Geográficamente, se han circunscrito principalmente a la región centro occidental del país, pero también al Parque Nacional Archipiélago Los Roques y el estado Sucre (Fig. 1).



Fig. 1. Mapa de Venezuela mostrando regiones estudiadas.

Inicio de los estudios sobre la ficoflora venezolana

Los estudios de la Ficoflora venezolana se remontan al año 1799, con las primeras colecciones de Humboldt y Bonpland (13) en su llegada al Nuevo Continente, en expediciones a Cumaná, La Guaira y Puerto Cabello. La mayoría de los estudios ficoflorísticos publicados en las primeras seis décadas del siglo XX fueron realizados, entre otros, por los

investigadores William R. Taylor, Manuel Díaz-Piferrer, Ernesto Foldats y E.K. Ganesan (17). A partir de ahí se realizaron muchas colecciones por parte de investigadores venezolanos, que contribuyeron a enriquecer el conocimiento de la Ficoflora. Las investigaciones ficoflorísticas del Laboratorio de Traqueophyta y Atraqueophyta, comenzaron en el estado Falcón, con un estudio realizado en las islas Cayo Borracho y Cayo Sal del Parque Nacional Morrocoy (4). Desde entonces, se han realizado distintas colecciones en las entidades mencionadas que han permitido ampliar nuestro conocimiento de la ficoflora, pero sobre todo a conformar una base de datos que incluye toda la historia ficoflorística venezolana y desarrollar aplicaciones informáticas que se detallarán más adelante.

Desarrollo de los estudios ficoflorísticos por parte del LTA-IBE

A partir del inicio de los estudios ficoflorísticos en Venezuela, por parte del LTA-IBE, podemos definir dos períodos. El primero se extiende desde el año 1982 hasta el año 2010, caracterizado principalmente por el estudio en las zonas intermareales en distintas localidades; a partir del año 2008 se comenzaron a utilizar las herramientas del buceo autónomo permitiendo la exploración a profundidades submareales y hasta aproximadamente 28 metros, permitiendo la exploración, conocimiento y reporte de condiciones ambientales distintas y el enriquecimiento de la ficoflora venezolana. El segundo período comienza a partir del año 2011, con el desarrollo de herramientas informáticas que permitieron la divulgación de los elementos de la importante base de

datos recabada hasta este momento, utilizando tecnología Web. A continuación mencionaremos los distintos aportes a la ficoflora de Venezuela en los dos períodos mencionados y que han sido publicados en los distintos volúmenes de las Memorias del Instituto de Biología Experimental (MIBE).

Período 1982-2010

En el volumen 1 de MIBE (15), publicado en 1998, se mencionan las contribuciones ficoflorísticas desde 1982 y hasta este momento, reportándose 167 registros de especies provenientes del litoral central, específicamente estado Aragua (bahía de Turiamo), estado Miranda (Chirimena, Punta Caimán) y estado Vargas (El Cusuy, Punta Care y Taguao). Se registran, además, 198 especies para el Parque Nacional Archipiélago Los Roques (PNALR) y 115 para el Parque Nacional Morrocoy (PNM) en el estado Falcón.

El volumen 3 de MIBE (12) publicado en 2001, recoge el reporte de 92 especies provenientes del sector oriental del estado Vargas (Catia La Mar, Macuto, Naiguatá, Los Caracas, Osma y La Sabana), así como 56 registros de la localidad de Carmen de Uria. Se destaca el hecho de que 31 especies corresponden a nuevos registros para la ficoflora del estado y 6 para Venezuela; además, se menciona la existencia de 120 especies para distintos lugares del PNM (16 nuevos registros para el parque y 2 nuevos para Venezuela). Adicionalmente, se mencionan estudios no florísticos que incluyen la presencia de lectinas, taninos e inhibidores de proteasas en 27 especies de macroalgas colectadas en los estados Falcón y Vargas; un estudio preliminar de la fenología de *Gelidium serrulatum* (Rhodophyta, Gelidiales) en el estado Vargas; un estudio de comparación de la ficoflora del PNALR, con la de los estados Aragua, Carabobo, Falcón, Nueva Esparta, Sucre y Vargas; un estudio morfológico de *Antitamnionella breviramosa* (Rhodophyta, Ceramiales) en el estado Vargas; un estudio taxonómico de *Polyphysa myriospora* (Chlorophyta, Acetabulariales) en el estado Falcón y, finalmente, un estudio de la cobertura algal de algunos arrecifes coralinos en el PNALR.

En el volumen 4 de MIBE (14), se reporta la continuación y culminación de estudios de línea base en el PNM; la descripción de *Schimmelmanna venezuelensis* (Rhodophyta, Gloiosiphoniaceae) por primera vez para la ciencia; el reporte de 11 nuevos registros para el estado Aragua (bahía de Turiamo); y el estudio de la cobertura algal, utilizando el método AGRRA (Atlantic and Gulf Reef Rapid Assessment) en distintos arrecifes coralinos del PNALR.

En el volumen 5 de MIBE (11), se menciona el comienzo de los estudios submareales por parte del LTA-IBE, comenzando por las localidades de Puerto Maya (estado Aragua) y Puerto Cruz (estado Vargas), de ambas localidades no existían reportes previos de macroalgas bénticas en el país, en estas dos localidades se realizaron muestreos a una profundidad promedio de 15 metros. En Puerto Maya, se identificaron 62 especies, 15 de las cuales constituyen nuevos registros para el estado. En Puerto Cruz, se identificaron 113 especies, 9 de las cuales constituyen nuevos registros para el estado. Adicionalmente, para el período señalado, se reportaron nuevos registros para el PNM, el PNALR y los estados Miranda, Nueva Esparta (Isla de Margarita) y Vargas.

El volumen 6 de MIBE (3), reseña el reporte de nuevos registros para los estados Falcón (PNM y Adícora), Aragua (Cepe, Jurelito, Ocumare, Playa la Punta y Puerto Maya), Miranda (Playa Corrales), Vargas (Puerto Cruz). Por otra parte, se emprendió un esfuerzo de recopilación, en conjunto con la Fundación Instituto Botánico de Venezuela, de las especies a incluir en el “Libro Rojo de la Flora Venezolana” en la categoría de “en peligro crítico” de acuerdo con los criterios de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN).

En el volumen 7 de MIBE (8), se actualiza la información ficoflorística existente para el PNALR, informando de la presencia de 124 especies; incluyendo 10 registros nuevos para el archipiélago y realizando importantes contribuciones como resultado de los estudios a nivel submareal. Además, se presentó la clave taxonómica digital FICLAV, en la cual se describe una aplicación informática orientada a la identificación de 15 géneros del phylum Heterokontophyta, combinando una clave taxonómica como componente del dominio de conocimiento, un árbol de decisión como modelo de predicción y tecnologías Web para el desarrollo de la aplicación.

El volumen 8 de MIBE (6), resume los resultados de cuatro grandes proyectos ya culminados, presentando la amplia actividad desarrollada por el laboratorio en el estudio de la ficoflora venezolana: 1) Estudio florístico de las localidades de Puerto Maya (estado Aragua) y Puerto Cruz (estado Vargas), 2) Inventario de la ficoflora del Parque Nacional Henri Pittier (estado Aragua) y sus áreas aledañas, 3) Ficoflora del Parque Nacional Archipiélago Los Roques, y 4) Creación del Catálogo Taxonómico Nacional de las Macroalgas Bénticas Marinas de Venezuela. Con el proyecto identificado con el número 3, se comienzan a dar los pasos hacia la digitalización de la data

registrada, al desarrollar el sitio Web Ficoflora del Parque Nacional Archipiélago Los Roques (16) y la publicación del Manual de Macroalgas Bénticas del Parque Nacional Archipiélago Los Roques (10). La publicación de los resultados del proyecto identificado con el número 4 (7), marca el inicio del segundo período mencionado en la introducción del presente trabajo.

Período 2011 - 2017

A partir del año 2011, nuestra línea de investigación se amplía hacia la divulgación de resultados ficoflorísticos incorporando herramientas informáticas y diversas tecnologías Web. En el presente volumen, recogeremos los avances en el desarrollo de esta línea de investigación durante los años 2016 y 2017. El proyecto “Ficoflora del Parque Nacional Archipiélago Los Roques” produjo como resultados principales, la creación de un sitio Web al cual se puede acceder mediante: www.ciens.ucv.ve/ficofloravenezuela/pnlar (9,17), además de la publicación definitiva del libro “Macroalgas bénticas del Parque Nacional Archipiélago Los Roques, Venezuela. Guía Ilustrada” (10).

Durante el año 2016 se culminó el proyecto “Creación del Catálogo Taxonómico Nacional de las Macroalgas Bénticas Marinas de Venezuela” (7), el cual persiguió como objetivo general: actualizar el inventario de algas marinas a nivel nacional, caracterizando, ilustrando morfoanatómicamente y validando taxonómicamente los registros disponibles. Además, se incluyó la información en una base de datos unificada con datos taxonómicos, ecológicos, geográficos, bibliográficos, mapas y fotografías. Esta base de datos está disponible al público en general, a través de una aplicación informática sobre plataforma Web, con funcionalidades de consulta de la información y herramientas de uso educativo. La base de datos desarrollada contiene hasta el momento un total de 5.101 registros a partir del examen de 221 referencias bibliográficas y en ella se reporta un total de 662 especies, provenientes de 534 ubicaciones en 12 entidades federales. El sitio Web Ficoflora Venezuela, se ha convertido en una herramienta de consulta útil para distintos estudios, fuente de información abierta, orientada al conocimiento de la flora de macroalgas bénticas marinas venezolanas, ha sido constantemente actualizada y ampliamente consultada en Venezuela y el continente americano. Desde sus inicios en el año 2009, ha venido evolucionando constantemente, con un incremento del 175% en el número de referencias bibliográficas incorporadas (Fig. 2).

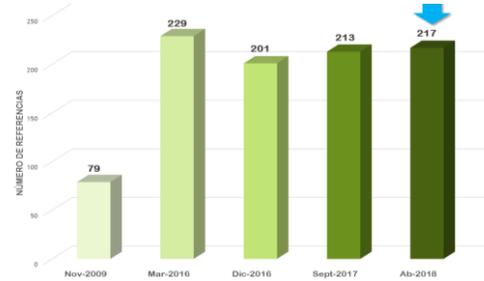


Fig. 2. Incorporación de referencias bibliográficas en Web Ficoflora Venezuela. La flecha azul marca el incremento de 175% en el número de referencias incorporadas.

El total de localidades incorporadas ha aumentado de 84 a 534. Para el día de su lanzamiento público, el 15 de mayo de 2016 había registrado 117 visitas, las cuales habían aumentado a 1.499 a finales del año 2017 (incremento del 1.281%) y a 3.418 visitas en mayo de 2018 (incremento del 2.921%) (Fig. 3).



Fig. 3. Visitas al Sitio Web Ficoflora Venezuela hasta mayo 2018.

Al presente, Web Ficoflora Venezuela se ha convertido en un catálogo digital fundamental para el desarrollo de los estudios ficoflorísticos desde cualquier lugar del mundo donde pueda consultarse. Por otra parte, la muy completa base de datos que soporta al sitio Web, permitirá establecer relaciones entre la distribución de las macroalgas bénticas y los factores que la afectan. En este orden de ideas, Gómez (1,2) realizó una primera verificación de esa data y publicó una reseña histórica, así como el estatus actual de los estudios sobre macroalgas bénticas marinas de Venezuela, en donde se incluye la actualización del catálogo taxonómico. El análisis de esta data, utilizando herramientas estadísticas especializadas, nos permitirá buscar relaciones entre la ficoflora y los distintos factores que la afectan; al respecto, Gómez *et al.* (5) comenzaron este estudio, calculando la riqueza específica de macroalgas bénticas para cada una de las entidades federales venezolanas y verificando si existen patrones de distribución particulares que respondan a las

variaciones ambientales de distinta índole presentes en la costa venezolana. La continuación de esta línea de investigación incorporando herramientas de sistemas de información geográfica, sin duda permitirá establecer las relaciones fitogeográficas de la ficoflora venezolana.

Agradecimientos

Los autores desean agradecer al CDCH de la UCV por su apoyo económico en la realización de los proyectos: PI-00-6422-2006, PI-03-7464-2009 y PG-03-8643-2013 y al FONACIT por su apoyo económico en la realización del proyecto: 2011001216.

Referencias

1. **Gómez, S.** (2017a). **Reseña histórica, catálogo actualizado y estatus actual de los estudios florísticos sobre macroalgas bénticas marinas de Venezuela.** Trabajo de Ascenso, Categoría Profesor Titular, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela, 154 p.
2. **Gómez, S.** (2017b). Reseña histórica y estatus actual de los estudios sobre macroalgas bénticas marinas en Venezuela. **Croizatia**, **17**(2): 121-138.
3. **Gómez, S.** (2012). Estatus actual del conocimiento de la ficoflora marina de la Región Centro Occidental de Venezuela. **MIBE**, **6**: 205-208.
4. **Gómez, S., Carballo, Y. y Suárez, L.** (2017). **Ficoflora de macroalgas bénticas marinas de Venezuela: I. riqueza específica y patrones de distribución en las distintas entidades federales.** LXVII Convención Anual de AsoVAC. 29 de noviembre al 01 de diciembre de 2017, Caracas, Venezuela.
5. **Gómez, S.** (1982). **Estudio sistemático de las algas macrobentónicas marinas de las islas coralinas: Cayo Borracho y Cayo Sal, Parque Nacional Morrocoy estado Falcón.** Trabajo de Ascenso, Categoría Profesor Asistente. Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela, 119 p.
6. **Gómez, S., García, M., Carballo, Y. y Gil, N.** (2016). Estatus actual de los estudios ficoflorísticos de la región Centro Occidental, en el marco de la ficoflora de Venezuela. **MIBE**, **8**: 165-168.
7. **Gómez, S., García, Y., Carballo, Gil, N. y Castillo, A.** (2016). **Creación del Catálogo Taxonómico Nacional de las Macroalgas bénticas marinas de Venezuela.** Informe final del proyecto PG 03-8643-2013/1. Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico, CDCH-UCV, 38 p.
8. **Gómez, S., García, M., Carballo, Y. y Gil, N.** (2014a). Avances en los estudios de la ficoflora marina de la región Centro Occidental de Venezuela. **MIBE**, **7**: 189-192.
9. **Gómez, S., García, M., Carballo, Y. y Gil, N.** (2014b). **Flora de macroalgas bénticas marinas del Parque Nacional Archipiélago Los Roques: Inventario, Georeferenciación y distribución geográfica.** Informe técnico final proyecto FONACIT N° 2011001216, 48 p.
10. **Gómez, S., García, M., Carballo, Y. y Gil, N.** (2014c). **Macroalgas bénticas del Parque Nacional Archipiélago Los Roques, Venezuela. Guía Ilustrada.** Ediciencias-UCV. ISBN: 978-980-00-2859-9, 213 p.
11. **Gómez, S. y Vera, B.** (2008). Ficoflora marina de la Región Centro Occidental de la costa venezolana. **MIBE**, **5**: 265-268.
12. **Gómez, S. y Vera, B.** (2001). Contribución al conocimiento de la ficoflora de la Región Centro Occidental de la costa venezolana. **MIBE**, **3**: 217-220.
13. **Humboldt, A. von & Bonpland, A.[J.G.B.]** (1808). Plantes équinoxiales recueillies au Mexique: dans l'île de Cuba, dans les provinces de Caracas, de Cumana et de Barcelone, aux Andes de la Nouvelle Grenade, de Quito et du Pérou, et sur les bords du rio-Negro de Orénoque et de la rivière des Amazones. Tome primus. pp. [i-ii], portr. Mutis, [iii-vii]-vii, 1-234, pl. 1a, 1b, 2a, 2b, 5-29, 30a, 30b, 31-65. **Turbingae [Tübingen]: apud J.G. Cotta.**
14. **Vera, B. y Gómez, S.** (2005). Estudios ficoflorísticos de la región marino-costera Centro Occidental. **MIBE**, **4**: 217-220.
15. **Vera, B. y Gómez, S.** (1998). Estudios ficoflorísticos del área Centro Occidental de la costa venezolana. **MIBE**, **1**: 221-224.
16. **Web Ficoflora del Parque Nacional Archipiélago Los Roques, Venezuela.** (2014). Publicación electrónica. UCV Caracas. Editores: Santiago Gómez, Yusneyi Carballo Barrera, Mayra García y Nelson Gil. <http://www.ciens.ucv.ve/ficofloravenezuela/pnalr>.
17. **Web Ficoflora Venezuela.** (2017). **Catálogo de la Ficoflora de Venezuela.** Publicación electrónica. UCV, Caracas. Editores: Santiago Gómez, Yusneyi Carballo-Barrera, Mayra García y Nelson Gil. <http://www.ciens.ucv.ve/ficofloravenezuela>.

Macrófitas marinas de la costa venezolana, borde sur del Caribe

BEATRIZ E. VERA^{1,2}, CELIA MORENO¹, SHEILA MARQUES PAULS³, DILSIA CANELÓN⁴ Y REYNALDO COMPAGNONE⁵

¹ Laboratorio de Ecología y Taxonomía de Macrófitas Marinas, Centro de Botánica Tropical Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela

² Postgrado en Botánica, Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias UCV.

³ Escuela de Biología, Facultad de Ciencias, UCV. ⁴ Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina, UCV. ⁵ Escuela de Química, Facultad de Ciencias, UCV. Correo: esverabe@gmail.com

La costa venezolana representa un área importante dentro del Mar Caribe, debido a la constante renovación de las aguas mediante el fenómeno de surgencia, que proporciona condiciones especiales para el desarrollo de la vegetación marina. Es así como día a día se incorporan nuevos registros y se explora su importancia dentro del ecosistema, para encontrar respuestas que subyacen en este hábitat. El potencial económico de estas macrófitas ha comenzado a dar resultados promisorios que se traducirán en un mejor aprovechamiento de los recursos naturales del ambiente marino.

Introducción

La costa venezolana se encuentra en el borde sur del Mar Caribe, constituyendo un área importante debido a los diversos fenómenos físico-químicos que presentan sus aguas costeras, entre ellas el fenómeno de surgencia (6), que aunado a la circulación de las corrientes marinas y los aportes de los ríos Amazonas y Orinoco (14) proporcionan condiciones muy favorables para el desarrollo de las macrófitas marinas (15) (**Fig. 1**). En lo respecta a las macroalgas, debido a la heterogeneidad de los sistemas y a la alta tasa de recambio en el ambiente marino, hemos venido incrementando el número de registros para nuestras costas (**Fig. 2**), lo cual nos indica que se hace necesario monitorear constantemente los diversos ambientes en los que pueden crecer y desarrollarse estos organismos. En consecuencia, se ha venido trabajando en el reconocimiento de la ficoflora del área centro-occidental (9,11,17,19), y más recientemente, se ha comenzado a estudiar algunas áreas de la región oriental, debido a que ésta es clave dentro del ecosistema marino Caribeño (18).

Estudios Taxonómicos

En la actualidad se han realizado inventarios de macroalgas y angiospermas marinas en las costas del estado Vargas (16,17), reconociendo nuevas especies de estas plantas y macroalgas del complejo *Laurencia*. De igual forma se han desarrollado estudios en la península de Paraguaná, incrementando el conocimiento de nuestra vegetación marina y ampliando la distribución geográfica en el mar Caribe (10,11,13,15,16).

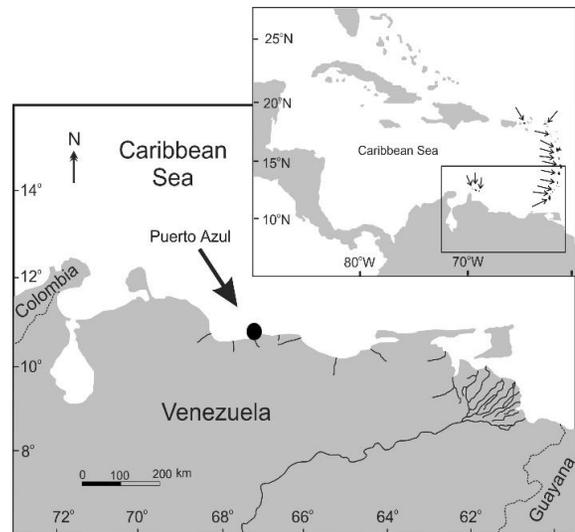


Fig. 1. Área de estudio.

Para el área de Paraguaná y costas aledañas del estado Falcón se han registrado más de un centenar de especies, entre las cuales unas 40 pueden resultar adiciones para este estado. El registro ficoflorístico de esta península se viene llevando a cabo en conjunto con la Dra. Sonia Ardito de la Universidad de Carabobo, quien inició este proyecto como parte de su año sabático en nuestro laboratorio durante enero-diciembre de 2011, continuando activamente esta cooperación hasta el presente (12,15,19). En el oriente del país, también hemos venido realizando estudios de las macroalgas presentes en el litoral rocoso de la zona noreste de la isla de Margarita. Todo esto ha contribuido al conocimiento de nuestra ficoflora, la cual parece más rica de lo que inicialmente se tenía pensado (5,7,18), ya que a través de los años de investigación, seguimos ubicando nuevas especies con potencial promisorio

en la obtención de productos naturales y una diversificación en sus propiedades, para tratar de resolver problemas de alimentación y salud pública dentro del país (1,2,4,5).

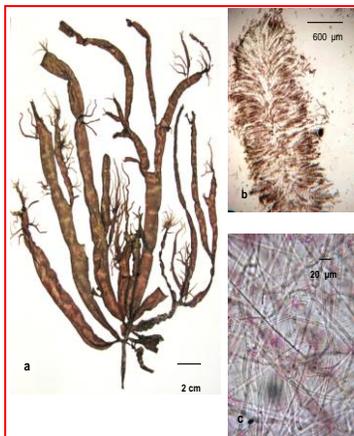


Fig. 2. *Nemalion cari-cariense*: Hábito del talo femenino. Nuevo registro para la costa venezolana.

Estudios Ecológicos. Hasta el presente se han venido desarrollando estudios sobre el fenómeno de surgencia el cual enriquece con aguas profundas, ricas en nutrientes la región costera de Venezuela y Colombia, Por ello hemos desarrollado algunos trabajos sobre las especies indicadoras de surgencia en la costa venezolana (8,14,18), obteniéndose datos interesantes sobre la presencia de estas especies, el cambio en su distribución y su cobertura en algunas áreas monitoreadas, particularmente en la isla de Margarita (18), en el oriente del país (**Fig. 3**).

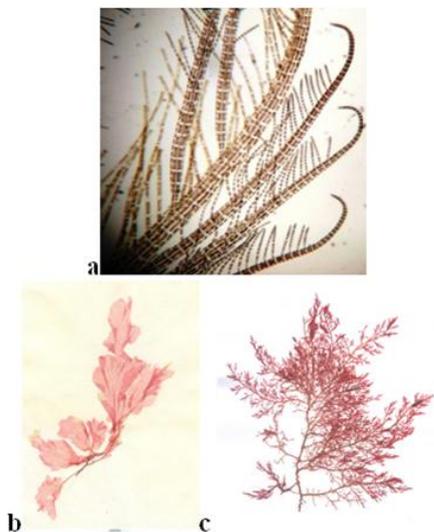


Fig. 3. a) *Cottoniella filamentosa*, b) *Grinelia americana*, c) *Laurencia dendroidea*: nuevos registros para la isla de Margarita, estado Nueva Esparta.

También se sigue estudiando la contaminación y su influencia dentro de las comunidades marinas costeras, ya que para proponer algunos organismos como indicadores de contaminación, se hace necesaria la comprobación de factores que intervienen en el ambiente y pueden enriquecer las aguas con nitrógeno y fósforo, sin que se deba a descargas de aguas residuales. Tradicionalmente se ha establecido que las Ulvales son indicadoras de contaminación; sin embargo, durante los períodos de enriquecimiento natural, también se desarrollan amplias coberturas de este grupo de macroalgas. Es el recambio de las especies en las comunidades de macroalgas el factor más indicativo de la calidad del ambiente, aunque especies del género *Grateloupia* son buenos indicadores de descargas de aguas residuales. Otra de las líneas de investigación en desarrollo es la de las angiospermas marinas y su papel dentro del ecosistema costero, la cual se ha venido realizando mediante la incorporación de trabajos interdisciplinarios con otros investigadores, conduciendo éstos a la evaluación de nuevos registros para la costa varguense dentro de la comunidad de *Halophila stipulacea* (**Fig. 4**). En Venezuela, son escasos los estudios realizados en la evaluación de las comunidades de macrofitas marinas, las cuales representan una alternativa interesante, como refugio y criadero de diversas especies de fauna, tales como peces, moluscos, crustáceos y otros invertebrados, no menos importantes dentro del ecosistema marino-costero (16,17,19).



Fig. 4. Habitantes de la comunidad de *Halophila stipulacea* en el estado Vargas.

La ecología de los ambientes marinos debe ser estudiada para establecer las condiciones en las que se desarrollan las diferentes especies que conforman las comunidades y modelan sus relaciones tróficas,

enriqueciendo la biodiversidad que sustenta fuentes potenciales de alimentos y medicinas (**Fig. 5**).

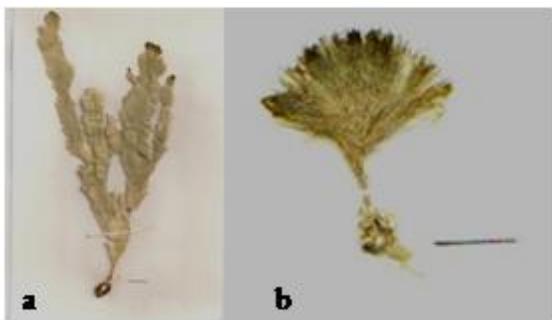


Fig. 5. a) *Udotea dixonii* y b) *Penicillus dumentosus*. Nuevos registros del estado Falcón.

Estudios aplicados

En los últimos años, además del estudio de las algas de arribazón y su aplicabilidad como fuente de microelementos, se han venido desarrollando estudios de compuestos químicos en las macrofitas marinas, obteniéndose alguna sustancias con valor farmacológico (**Fig. 6**), como parte de una cooperación con la Escuela de Bioanálisis de la Facultad de Medicina y con la Escuela de Química de la Facultad de Ciencias, representadas por la Dra. Dilsia Canelón y el Dr. Reynaldo Compagnone. De esta cooperación se han desarrollado algunos trabajos de grado que enriquecen el conocimiento de la utilidad de nuestras macrofitas marinas (1,4).



Fig. 6. a) *Udotea*, b) *Halimeda*, c) *Penicillus*: tres géneros de Bryopsidales fuente de anticoagulantes.

Investigaciones en desarrollo.

En la actualidad, se continúa el estudio de las macroalgas del complejo “*Laurencia*” en Venezuela, como parte de un macroproyecto para el área del Océano Atlántico, en cooperación con investigadores del Instituto Botánico y la Universidad de São Paulo, Brasil, bajo la dirección de la Dra. Valeria Cassano y la Dra Mutue Toyota Fujii. Hasta el presente se han registrado unas 6 especies entre las que figura un nuevo registro

potencial para la Ciencia y se sigue investigando el grupo, con potencial farmacológico promisorio (4,5).

Consideraciones finales

El desarrollo de líneas aplicadas de investigación, junto a las convencionales, nos permitirán asumir el reto de proporcionar soluciones a la sociedad en la que desarrollamos nuestra actividad que constituye un modesto aporte en estos momentos difíciles que atravesamos día a día.

Agradecimientos

Los autores desean agradecer al CDCH de la UCV por el financiamiento del proyecto: PI-03-7360-2008. A la Universidad de Carabobo y a la Universidad de Oriente, Núcleo Nueva Esparta, en especial al Centro Regional de investigaciones Ambientales (CRIA), por el apoyo logístico en las colecciones de macroalgas de las áreas en estudio. De igual forma deseamos agradecer a los estudiantes que han venido realizando sus Trabajos de Grado en nuestra Universidad que vence las sombras.

Referencias

1. Arata, P., Quintana, I., Canelón, D., Vera, B., Compagnone, R. y Ciancia, M. (2015). Chemical Structure and anticoagulant activity of highly Piruvilated Sulfated Galactans from green Seaweed of the order Bryopsidales. **Carbohydrates Polymers**, **122**: 376-385.
2. Brito A., Vera B., Ardito S. y Farsi, G. (2012). *Penicillus dumentosus* (Lamouroux) Blainville y *Penicillus lamourouxii* Decaisne (Chlorophyta, Udoteaceae) nuevos registros para la costa venezolana. **Acta Cient. Ven.**, **96**: 45-51.
3. Bula-Meyer G. (1977). Algas marinas bénticas indicadoras de un área afectada por aguas de surgencia frente a la costa Caribe de Colombia. **Anales Inst. Invest. Mar. Punta Betín**, **9**: 45-71.
4. Canelón, D., Ciancia, M., Suárez A., Compagnone, R. y Matulewicz, M. (2014). Structure of highly substituted agarans from the red Seaweeds *Laurencia obtusa* y *Laurencia filiformis*. **Carbohydrates Polymers**, **101**: 705-713.
5. Cassano, V., Vera B., Ardito, S., Gómez, S., Soares, L., Senties, A., Collado Vides, L. y Toyota Fujii, M. (2017). Análises moleculares revelam uma potencial espécie nova do complexo *Laurencia* (Ceramiales, Rhodophyta) na costa venezolana. Resúmenes del XI Congreso de Ficología de Latinoamérica y el Caribe, Cali, Colombia. p. 236.

6. **Castellanos, P., Varela, R. y Muller-Karger, F.** (2002). Descripción de las áreas de surgencia sur del Mar Caribe examinadas por el sensor infrarrojo AVHRR. **Mem. Fund. La Salle. Cien. Nat.**, **154**: 55-76.
7. **Díaz-Piferrer, M.** (1967). Efectos de las aguas de afloramiento en la flora marina de Venezuela. **Carib. J. Sci.**, **7**: 1-13.
8. **Díaz-Pulido, G. y Garzón-Ferreira, J.** (2002). Seasonality in algal assemblages on upwelling-influenced coral reef in the Colombian Caribbean. **Bot. Mar.**, **45**: 284-292.
9. **Eizaguirre, M y Vera, B.** (2013). *Dictyopteris jolyana* Oliveira & Furtado (Dictyotales, Phaeophyceae) nuevo registro para la costa venezolana. **Acta Bot. Venez.**, **36**: 25-31.
10. **Ganesan, E.K.** (1989). **A catalog of benthic marine macroalgae and seagrasses of Venezuela.** Fondo Editorial CONICIT, Caracas, Venezuela.
11. **Gómez, S., García, M. y Gil, N.** (2013). Adiciones a la Ficoflora marina de Venezuela. I.- Rhodomelaceae (Rhodophyta). **Acta Bot. Venez.**, **36** (2): 186-195.
12. **López, B., Vera, B y Conde, J.E.** (2009). Macroalgas asociadas a las raíces de *Rhizophora mangle* L. en la península de Paraguaná, estado Falcón, Venezuela. **Bol. Inst. Oceanog. de Venezuela**, **48** (1):11-21.
13. **Miloslavich, P., Klein, E., Martín, A., Bastidas, C., Marín, B. y Spiniello, P.** (2005). Venezuela en: **Caribbean Marine Biodiversity the known and the unknown** (Miloslavich, P & Klein E. ed.): 109-136 p.
14. **Muller-Karger, F., Varela, E., Thunnell, R., Scranton, M., Astor, Y., Zhang, H. y Hu, C.** (2004). Processes of Coastal Upwelling and Carbon Flux in the Cariaco Basin. **Deep-Sea Research II**. **51/10-11**: 927-943.
15. **Vera, B. y Ardito, S.** (2014). Las macrofitas marinas de la costa venezolana, borde sur del Mar Caribe. Resúmenes X Congreso Latinoamericano de Ficología. México, Metepec. p. 102.
16. **Vera, B., Collado-Vides, L., Moreno, C. y Van Tussenbroek, B.** (2014). *Halophila stipulacea* (Hydrocharitaceae): A recent introduction to the continental waters of Venezuela. **J. Carib. Sci.** **48**(1): 66-70.
17. **Vera, B. y Linares, J.** (2011). Nuevos Registros de macroalgas (Rhodophyta) para la costa del estado Vargas. **XIX Congreso Venezolano de Botánica.** <http://127.0.0.1:4001/docu.php?pelo=166>.
18. **Vera, B. y Velásquez, A.** (2011). Macroalgas indicadoras de surgencia dentro del cambio ambiental. **Resúmenes del XIX Congreso Venezolano de Ecología** p. 522.
19. **Vera, B., Moreno, C., Marques-Pauls, S., Paz, C., Velásquez, A. y Ardito, S.** (2016). Ecología y Taxonomía de Macrofitas Marinas. **MIBE**, **8**: 169-172.

ÍNDICE DE AUTORES

- ALVEZ, B. 21
AMERUOSO L., M. 61, 73
ANDRADE, M. 61
APOLINARIO, G. 69
ARVELO, F. 29, 33
ÁVILA-LOVERA, E. 93
BELANDRIA, R. 105
BENAIM, G. 5, 9, 13
BLANCO, H. 61, 93
BOLAÑOS, M. 89
BRICEÑO, H. 77
BRITO, A. 57
CÁCERES, A. 81, 85
CÁCERES-MAGO, K. 81, 85
CALDERÓN, C. 33
CANELÓN, D. 113
CARBALLO BARRERA, Y. 109
CASTILLO, A. 105
CIANEGHEROTTI, C. 29
COMPAGNONE, R. 113
DAGGER BOYER, F. 17
DUARTE, F. 21
ESCALA, M. 97
FUENMAYOR, J. 41
GARCÍA, E. 57, 61
GARCÍA-ALZATE, R. 37
GÓMEZ ACEVEDO, S. 109
GONTO, R. 101
GONZÁLEZ RIVAS, E.J. 49
GONZÁLEZ, F. 33
GUEVARA, P. 41
GUTIÉRREZ, A. 33
HERMOSO, L. 57, 61, 65, 73, 97
HERNÁNDEZ, I. 81
HERNANDEZ, V. 9
HERRERA, L. 37
INDRIAGO, A. 73
KOUZNETSOV, V.V. 29
LINARES, Y. 61
LLAMBÍ, L.D. 81
LOYAGA, D. 89
LOZANO-ARIAS, D. 37
MARCANO, A.K. 69
MARQUES PAULS, S. 113
MÁRQUEZ, M. 81
MÁRQUEZ, M.L. 25, 45
MARTINEZ, N. 9, 13
MARTÍNEZ, P. 21
MENDOZA, M. 5
MENDOZA, M.D. 49
MENDOZA, P. 89
MENDOZA-LEÓN, A. 37
MENÉNDEZ-YUFFÁ, A. 65
MERENTES, E. 25
MIJARES, A. 5
MONDRAGÓN, A. 101
MONTROYA, J.V. 49
MORENO, C. 113
MOROCOIMA, A. 37
MOVIL, O. 93
OROPEZA, M. 69, 73
PAYARES, G. 45
PÉREZ, M. 49
PÉREZ-GORDONES, M.C. 1, 5
PINTO, A. 9, 13
PLASENCIA, D. 1
RAMÍREZ, N. 77
RAMÍREZ-IGLESIAS, J.R. 5
RAYMÚNDEZ, M.B. 101
REINA, Y. 73
REYES-LUGO, R.M. 37
REYNEL, V. 89
ROBLES-CASTELLANOS, M. 29
RODRÍGUEZ, J. 9, 13
ROJAS-RUIZ, F.A. 29
ROMERO, A. 29, 33
ROMERO, P.J. 1, 5
SAGASTI, J. 45
SÁNCHEZ, A. 25
SANOJA, C. 45
SELVITELLA, S. 25
SIERRAALTA, D. 81
SILVA, A. 101
SOJO, F. 29, 33
SUÁREZ, A.I. 29
TÁRANO MIRANDA, Z. 53
TAVARES, L. 1
TEZARA, W. 89, 93
THOMAS, L. 41
VARGAS, T.E. 57, 61, 73
VERA, B.E. 113
YÉPEZ, Y. 69
ZAPATA, O. 49
ZÁRRAGA, F. 81

Este libro se editó en el
Instituto de Biología Experimental,
Universidad Central de Venezuela
Caracas, febrero de 2019

