

APLICACIÓN DE VIRTUAL RFLP ANALISIS PARA CARACTERIZACIÓN DE FITOPLASMAS DE AMARILLAMIENTO LETAL EN PALMILLA DE TACO (BRAHEA BRANDEGEEI) EN BAJA CALIFORNIA SUR

Arevik Poghosyan¹, Julio Hernández-Gonzalez¹, Maria Narvaez-Cab², Carlos Oropeza-Salin², Vladimir Lebsky¹.

¹CIBNOR, S.C., 23096, La Paz, BCS; ²CICY, 97200, Mérida, Yucatán. Fax: (612)1253625.

Autor de contacto: arevik04@cibnor.mx

Recibido: 30/agosto/2016

Aceptado: 29/septiembre/2016

Publicado: 19/octubre/2016

Palabras clave: *B. brandegeei*, fitoplasma AL, RFLP virtual

INTRODUCCIÓN

Amarillamiento letal (AL), la enfermedad fatal de palmeras, está asociada con fitoplasmas (antes-MLO), bacterias sin pared celular (clase Mollicutes), colonizadores de floema de plantas infectadas. En México AL se ha encontrado en la península Yucatán, costas Pacíficas y zona central (1).

En 2014 se detectaron fitoplasmas en la palma *B. brandegeei* con los síntomas semejantes al AL en estado de Baja California Sur (BCS), aplicando microscopía electrónica de barrido (MEB) y PCR anidado (2).

RFLP análisis de las secuencias de los genes de 16S-rRNA permite identificar y clasificar fitoplasmas en distintos grupos y subgrupos de 16Sr (3). Con la simulación

computacional se logro obtener RFLP virtual (*in silico*) (4). Actualmente fitoplasmas de AL, detectadas en América, se atribuyen al grupo 16SrIV de '*Candidatus* Phytoplasma palmae' con seis subgrupos (1).

El objetivo de trabajo fue caracterizar los fitoplasmas detectadas en *B. brandegeei* a través de RFLP *in silico* (4).

MATERIAL Y MÉTODOS

ADN total fue extraído de las muestras de raquis (2a) e inflorescencias (3a) de palmas (4). PCR anidado se realizo con las cebadores universales P1/P7 seguido con R16F2n/R16R2 (3). Amplicones representativos (1.2kb) purificaron, clonaron en pGEM-T easy vector, secuenciaron, alinearon y analizaron en programa BLAST y utilizando on-line *iPhyClassifier* (4).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis de secuencias de dos amplicones derivados de las muestras 2a y 3a revelo su similitud con una cepa de referencia de '*Candidatus* phytoplasma palmae' (98% y 99 % respectivamente), ubicándolas en el grupo 16SrIV de AL.

Resultados de la digestión *in silico* de las secuencias con 23 enzimas de restricción y la comparación de sus patrones

empleando RFLP virtual con patrones de las muestras de referencia de subgrupos 16SrIV-A, 16SrIV-B, 16SrIV-C y 16SrIV-D presentaron diferencia notable entre los

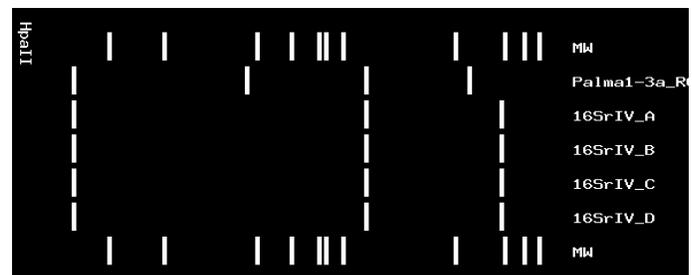


Figura.1. RFLP patrones de gel virtual; banda 1- bp marcador de peso molecular, banda 2 – muestra 3a, bandas 3,4,5,6- patrones de los subgrupos correspondientes de 16SrIV(A,B,C,D).(Imagen original rotada a 90°).

amplicones de dos muestras, 2a y 3a. Digestión con una de las enzimas clave (HpaII) mostro 4 bandas para la secuencia 3a (Fig.1), y tres bandas para la secuencia 2a (cuadro 1), así como para los amplicones de referencia de los cuatro subgrupos del grupo 16SrIV (Fig.1).

Cuadro 1. RFLP análisis con enzimas de digestión; x- muestra de referencia (AF237615); y -muestra 2a; Nx y Ny-número total de bandas de cada enzima; Nxy- numero de las bandas similares

Enzyme	AluI	BfaI	DraI	EcoRI	HhaI	HinfI	HpaI	HpaII	KpnI	MseI	RsaI
Nx	4	3	2	2	2	2	2	3	1	6	3
Ny	4	3	2	2	2	2	2	3	1	6	3
Nxy	4	2	2	2	2	2	2	3	1	6	3

Con base de distribución de patrones de restricción y su coeficiente de similitud (F) de 0.98 con la cepa de referencia de GenBank, fitoplasmas de la muestra 2a se clasificaron como cepas del grupo 16SrIV-D, mientras que los patrones derivados de muestra 3a mostraron la máxima similitud con los del grupo 16SrIV-A (F=0.95).

CONCLUSIONES

Con el uso de RFLP virtual, aplicando *iPhyClassifier* (4) se logro por primera vez identificar fitoplasmas de AL en palma *Brahea brandegeei*, endémica para estado de BCS. Estos fitoplasmas se clasificaron en dos

subgrupos distintos del grupo 16SrIV ‘*Candidatus* phytoplasma palmae’: fitoplasmas detectados en raquis (2a) se agruparon en 16SrIV-subgrupo D, y los detectados en inflorescencias (3a)- en el subgrupo 16Sr-A, con $F < 0.97(4)$. La identificación de fitoplasmas en raíz de palma está en pie, y el análisis filogenético se ajustara la posición taxonómica de fitoplasmas de AL en *B. brandegeei*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sullivan M, Harrison N (2013). CPHST Pest Datasheet for ‘*Candidatus* Phytoplasma palmae’ and related strains. <http://caps.ceris.purdue.edu/>.
2. Poghosyan A. (2015). Palmilla de taco (*Brahea brandegeei*), nueva especie de palmas con el síndrome de amarillamiento letal? 4º Congreso Internacional en Ecología de enfermedades, Kalaan-Kab. La Asociación Mexicana de Medicina de Conservación, Kalaan-Kab A.C. Villahermosa, Tabasco, 13-15 de octubre 2015. 58-58.
3. Lee I-M, Gundersen-Rindal D, Davis R and Bartoszyk I (1998). Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. Int J Syst Bacteriol. 48: 1153-1169.
4. Zhao Y, Wei W, Lee I.-M, Shao J, Suo X and Davis R (2009). Construction of an interactive online phytoplasma classification tool, *iPhyClassifier*, and its application in analysis of the peach X-disease phytoplasma group (16SrIII). Int J Syst Evol Microbiol. 59: 2582–2593.