

DIRECCIÓN DEL CENTRO NACIONAL DE REFERENCIA FITOSANITARIA

ÁREA DE DIAGNÓSTICO FITOSANITARIO

Laboratorio de Biología Molecular

Ficha técnica para el diagnóstico de fitoplasmas en fresa

Agosto de 2020

FICHA TÉCNICA PARA LA DETECCIÓN DE FITOPLASMAS EN FRESA

1. INTRODUCCIÓN

Los miembros de la clase *Mollicutes* son fenotípicamente distintos de otras bacterias puesto que carecen de pared celular y son de menor tamaño. Los *Mollicutes* usualmente viven como comensales, y en muchos artrópodos pueden encontrarse especies de endosimbiontes. Este grupo posee las siguientes características distintivas: son altamente pleomórficos, debido a la carencia de pared celular y cuando ésta llega a estar presente son Gram negativos; pueden variar en forma de esféricas a filamentos ramificados de diámetro uniforme con medidas de 125-250 nm y 10-150 µm en longitud, sin flagelos.

Los fitoplasmas (*Candidatus Phytoplasma* spp.) son organismos procariones, carentes de pared celular o bien con pared celular no convencional, residen en el tracto digestivo de insectos chupadores que se alimentan del floema de las plantas, como chicharritas, cixiidos, triozidos, etc., esta razón los vuelve fácilmente transmisibles a los vasos del floema de un amplio rango de plantas cultivadas y silvestres (Kado, 2010).

Filogenéticamente los análisis del gen 16S rDNA han demostrado que los fitoplasmas son un grupo monofilético de microorganismos dentro de la clase *Mollicutes*, probablemente a nivel de género (Gundersen et al., 1994; Seemuller et al., 1994). Estos organismos no pueden ser nombrados de acuerdo al código de bacteriología, se les ha asignado la categoría de *Candidatus*, como necesidad de registrar a éste nuevo taxa, que no pueden ser cultivados y cuya descripción fue referida principalmente a análisis de secuencias del DNA.

De manera general los síntomas inducidos por estos procariones suelen ser muy típicos y se ven asociados a desordenes fisiológicos derivados de la colonización del sistema vascular como los amarillamientos o enrojecimientos y coloraciones purpúreas, también pueden encontrarse las deformaciones de frutos, órganos florales, vegetativos, etc.

Escoba de bruja de la fresa (Strawberry witches'broom *Phytoplasma*)

El fitoplasma responsable de causar la escoba de bruja en fresa, se encuentra actualmente clasificado dentro del grupo I-I y I-K pertenecientes a la especie *Candidatus Phytoplasma asteris* (Bertaccini et al., 2014), uno de los fitoplasmas de mayor importancia económica a nivel internacional por el rango de hospedantes tan amplio que presenta.

Los síntomas típicos inducidos por Strawberry witches'broom *Phytoplasma* se presentan como clorosis generalizadas, enrojecimiento del follaje y filodias en los órganos florales, cuando el receptáculo o tálamo alcanza a formarse, en lugar de presentar aquenios (Frutos) se puede observar en su lugar la proliferación de pequeñas hojas (**Figura 1**).



Figura 1. Filodia en fruto de fresa por Strawberry Witches'broom *Phytoplasma*.

2. DETECCIÓN MOLECULAR

2.1 Extracción de DNA

Método de CTAB al 2 %

La extracción de DNA puede hacerse mediante diferentes métodos, incluyendo Kits Comerciales siempre y cuando se obtenga DNA con la calidad y pureza abajo mencionada en la Sección **2.2 Verificación de la calidad del DNA**;

A continuación, se detalla el procedimiento usado para la extracción de DNA.

1. Pesar en una balanza analítica 100-200 mg de nervaduras centrales o brotes jóvenes si el hospedante se encuentra asintomático; si existen síntomas tomar la zona de avance del tejido afectado, colocarlo en un mortero estéril y agregar nitrógeno líquido para pulverizar, transferir el macerado a un tubo de 2 mL y agregar 1.5 mL de *buffer* CTAB 2 %.

Nota: En caso de no contar con nitrógeno, congelar el mortero a -70 °C y macerar posteriormente el tejido.

Agregar β -Mercaptoetanol (2 μ L/1000 μ L) y agregar 30mg de polivinilpirrolidona debido a que el tejido de fresa se fenoliza rápidamente.

2. Incubar los tubos con las muestras a 65 °C por 30 minutos.
3. Dejar enfriar los tubos en hielo por 2 minutos y centrifugar 15 minutos a 13 000 rfc a 4 °C.
4. Transferir de 600-800 μ L de sobrenadante a otro tubo estéril de 2 mL, y agregar 500 μ L de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1), mezclar por inversión para homogenizar la muestra y centrifugar a 13 000 rfc por 15 minutos a 4 °C, transferir 500-700 μ L a un tubo de 1.5 mL.

Nota: realizar una segunda vez con cloroformo para clarificar la muestra si es necesario.

5. Agregar $\frac{1}{2}$ de isopropanol, mezclar por inversión y dejar precipitar 60 minutos a -20 °C o si es posible toda la noche a 4 °C, centrifugar a 12 000 rfc por 10 minutos a 4 °C.
6. Decantar el sobrenadante procurando no tirar la pastilla y lavarla con 1000 μ L de etanol 70 % a 4 °C. Centrifugar a 13 000 por 5 minutos a 4 °C. (Este paso puede repetirse)
7. Dejar secar la pastilla a temperatura ambiente hasta que todos los residuos de etanol se hayan evaporado (15 minutos aproximadamente) y resuspender en 50 μ L de agua libre de nucleasas.

2.2 Verificación de la Calidad del DNA

El DNA obtenido del proceso de extracción debe cumplir con una pureza, medida por espectrofotometría, de: 1.8-2.0 en la relación $A_{260/280}$ (Lehninger, 1975) y 1.8-2.0 en la relación $A_{260/230}$ (Von Ahlfen & Schlumpberger, 2010; The Quality Control Platform of Saint Louis, 2009).

2.3 PCR anidada con iniciadores generales.

Para la detección de fitoplasmas es necesario primero realizar un PCR que posteriormente será tomado como molde para un PCR final, este procedimiento se conoce como PCR anidada.

Se realiza el primer PCR con los iniciadores P1/P7. Una vez obtenido el producto de PCR, se realiza una dilución 2:48 y se prosigue con la segunda PCR, ésta se realiza con los iniciadores R16F2n/R16R2 y fU5/rU3

Para la primera PCR se utilizarán los iniciadores P1/P7 (Deng y Hiruki, 1991; Smart et al., 1996)

Cuadro 1. Secuencias de los primers para identificar Fitoplasmas.

Tipo	Nombre	Secuencia (5' → 3')	Tamaño (pb)
Sentido	P1	5'-AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT-3'	1800 pb
Antisentido	P7	5'-CGTCCTTCATCGGCTCTT-3'	
Sentido	fU5	5'-CGGCAATGGAGGAAATC-3'	882 pb
Antisentido	rU3	5'-TTCAGCTACTCTTTGTAACA-3'	
Sentido	R16F2n	5'-GAAACGACTGCTAAGACTGG-3'	1248 pb
Antisentido	R16R2	5'-TGACGGCGGTGTGTACAAACCCCG-3'	

1) Realizar la mezcla de reacción de acuerdo al **Cuadro 2**.

Cuadro 2. Mezcla de reacción con los oligos P1/P7

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	Volumen (µL)
Buffer de PCR	10X	1X	2.5
MgCl₂	50 mM	1.5 mM	0.75
dNTPs	10 mM	0.20 mM	0.5
P1	10 pmol/µL	0.40 pmol/µL	1
P7	10 pmol/µL	0.40 pmol/µL	1
Taq polimerasa	5 U/µL	0.05 U/µL	0.25
DNA	50-200 ng/ µL	---	5
Agua °PCR	---	---	14
		Volumen final	25

2) Programar el termociclador de acuerdo a lo descrito en el **Cuadro 3:**

Cuadro 3. Programa del termociclador para la PCR con los iniciadores P1/P7

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94	5 min	1
Desnaturalización	94	1 min	
Anillamiento	54	50 s	35
Extensión	72	2 min	
Extensión final	72	5 min	1
Conservación	4	∞	

3) Una vez finalizada la reacción, hacer una dilución del producto de PCR en agua 2:48.

4) Para la PCR anidada utilizar dos juegos de iniciadores, fU5/rU3 propuestos por Lorenz et al., 1995; y R16F2n/R16R2 obtenidos de Gundersen y Lee, 1996, de acuerdo al **cuadro 4 y 5** respectivamente.

Cuadro 4. Mezcla de reacción con los oligos fU5/rU3

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	Volumen (µL)
Buffer de PCR	10X	1X	2.5
MgCl₂	50 mM	1.5 mM	0.75
dNTPs	10 mM	0.20 mM	0.5
fU5	10 pmol/µL	0.40 pmol/µL	1
rU3	10 pmol/µL	0.40 pmol/µL	1
Taq polimerasa	5 U/µL	0.05 U/µL	0.25
PPCR diluido	---	---	5
Agua °PCR	---	---	14
		Volumen final	25

Cuadro 5. Mezcla de reacción con los oligos R16F2n/R16R2

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	Volumen (µL)
Buffer de PCR	10X	1X	2.5
MgCl₂	50 mM	1.5 mM	0.75
dNTPs	10 mM	0.20 mM	0.5
R16F2n	10 pmol/µL	0.40 pmol/µL	1
R16R2	10 pmol/µL	0.40 pmol/µL	1
Taq polimerasa	5 U/µL	0.05 U/µL	0.25
PPCR diluido	---	---	5
Agua °PCR	---	---	14
		Volumen final	25

- 5) Programar el termociclador de acuerdo a lo descrito en el **Cuadro 6 y 7** respectivamente:

Cuadro 6. Programa del termociclador para la PCR con los iniciadores fU5/rU3

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94	4 min	1
Desnaturalización	94	45 s	
Anillamiento	56	45 s	39
Extensión	72	45 s	
Extensión final	72	7 min	1
Conservación	4	∞	

Cuadro 7. Programa del termociclador para la PCR con los iniciadores R16F2N/R16R2

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94	min	1
Desnaturalización	94	1 min	
Anillamiento	55	2 min	35
Extensión	72	3 min	
Extensión final	72	10 min	1
Conservación	4	∞	

Controles para las pruebas moleculares

En todos los ensayos de PCR descritos en este protocolo, es necesario incluir los siguientes controles mismos que se agregan en la primer reacción (P1/P7).

Control positivo: asegura la funcionalidad de los reactivos de PCR. Contiene (DNA/clona) o es la plaga de interés y deberá estar confirmado mediante secuenciación.

Control negativo de matriz: este control corresponde a un extracto de matriz sin la plaga. Asegura que no exista reacción cruzada con la matriz o contaminación durante la extracción.

Control negativo de reactivos: es la mezcla de reacción sin molde (DNA/clona). Descarta falsos positivos y contaminación de la reacción.

Interpretación de resultados

Los resultados son válidos solamente bajo los siguientes criterios

El control positivo genera una banda de acuerdo al **Cuadro 1**

El control negativo de matriz no debe de generar bandas.

El control negativo de reactivos no debe de generar bandas.

Secuenciación-Identificación de plaga

Para dar un resultado positivo a Strawberry witches' broom *Phytoplasma* es necesario secuenciar el amplicón del producto de PCR de R16F2n/R16R2 y fU5/rU3, se considera aceptada la identificación después de realizar el análisis de secuencias

2.4 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorfism)

Para la determinación de subgrupos del gen 16S rDNA basados en la clasificación de Bertaccini et al., 2014, utilizar el siguiente listado de enzimas de restricción: *AluI*, *BamHI*, *Bfal*, *BstUI*, *DraI*, *EcoRI*, *HaeIII*, *HhaI*, *Hinfl*, *HpaI*, *HpaII*, *KpnI*, *MseI*, *Sau3AI*, *RsaI*, *SspI*, *TaqI*.

Utilizar el Producto de PCR (PPCR) obtenido a partir de los iniciadores R16F2n/R16R2 y digerir de acuerdo a las instrucciones del fabricante de cada enzima, seguir los patrones propuestos por Wei et al., 2007 (**Figura 2**), para asignar subgrupo a cualquier sospechoso.

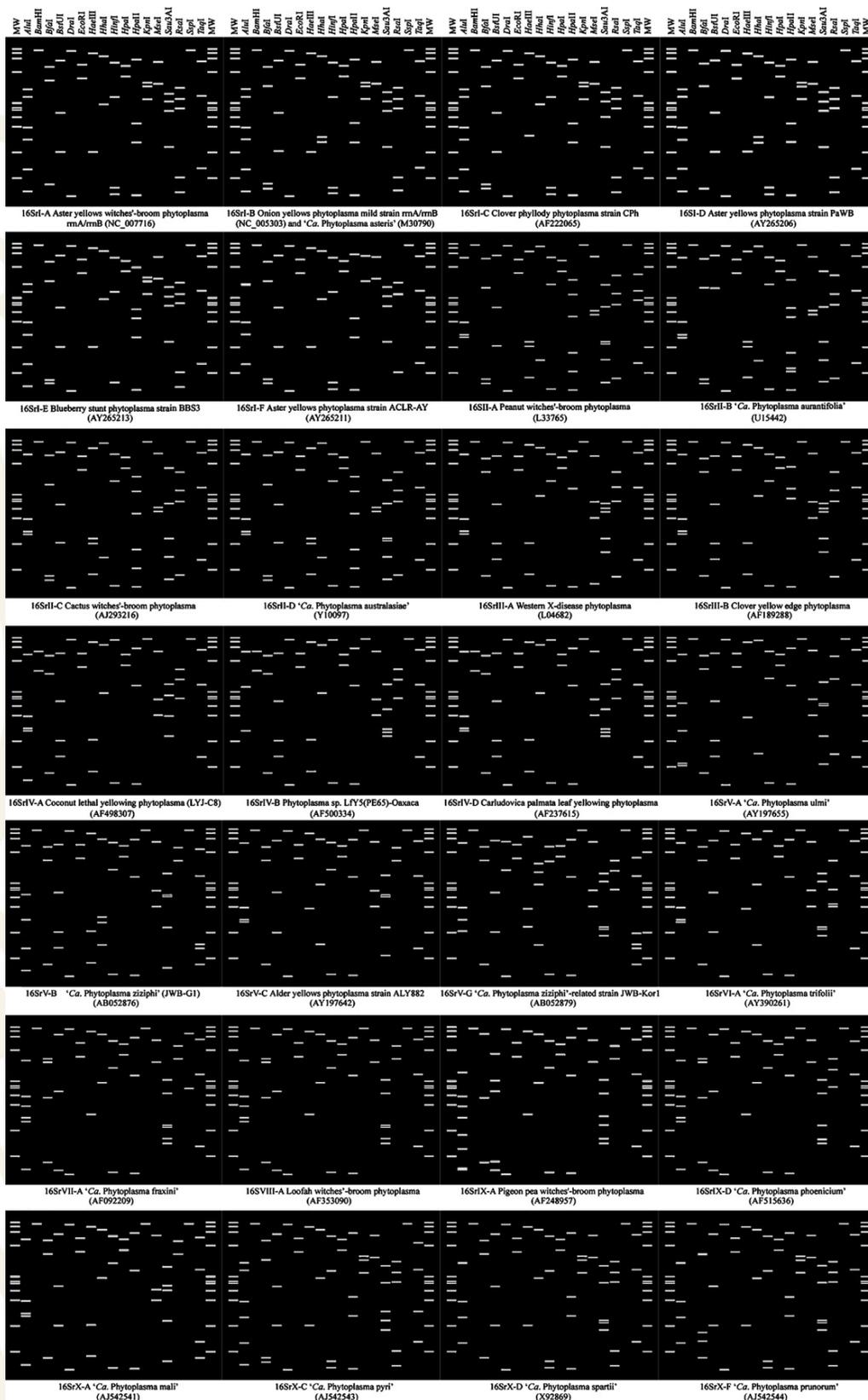


Figura 2. Patrones de RFLP utilizados para la clasificación de fitoplasmas.

Tomado de: Wei, W., Davis, R., Lee, I., & Zhao, Y. (2007). Computer-simulated RFLP analysis of 16S rRNA genes: identification of ten new phytoplasma groups.

3. REFERENCIAS

- Bertaccini, A., Duduk, B., Paltrinieri, S., y Contaldo, N. (2014). Phytoplasmas and Phytoplasma Diseases: A Severe Threat to Agriculture. *American Journal of Plant Sciences*, 05(12), 1763–1788. <https://doi.org/10.4236/ajps.2014.512191>
- Deng, S., y Hiruki, C. (1991). Amplification of 16S rRNA genes from culturable. *Journal of Microbiological Methods*, 14, 53–61.
- Gundersen, D. E., & Lee, I. M. (1996). Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathologia Mediterranea*, 35(3), 144–151.
- Gundersen, D. E., Lee, I. M., Rehner, S. A., Davis, R. E., & Kingsbury, D. T. (1994). Phylogeny of mycoplasma-like organisms (phytoplasmas): A basis for their classification. *Journal of Bacteriology*, 176(17), 5244–5254. <https://doi.org/10.1128/jb.176.17.5244-5254.1994>
- Kado, C. I. (2010). CHAPTER 3: Classification of Plant-Pathogenic Bacteria. In *Plant Bacteriology* (pp. 21–62). <https://doi.org/10.1094/9780890545034.003>
- Lorenz, K. H., Schneider, B., Ahrens, U., & Seemuller, E. (1995). Detection of the apple proliferation and pear decline phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and nonribosomal DNA. In *Phytopathology* (Vol. 85, Issue 7, pp. 771–776). <https://doi.org/10.1094/Phyto-85-771>
- Seemuller, E., Schneider, B., Maurer, R., Ahrens, U., Daire, X., Kison, H., Lorenz -, K. H., Firrao, G., Avinent, L., Sears, B. B., & Stackebrandt, E. (1994). Phylogenetic classification of phytopathogenic mollicutes by sequence analysis of 16S ribosomal DNA. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44(3), 440–446. <https://doi.org/10.1099/00207713-44-3-440>
- Smart, C. D., Schneider, B., Blomquist, Ç. L., Guerra, L. J., Harrison, N. A., Ahrens, U., Lorenz E Seemüller, K. H., & Kirkpatrick, B. C. (1996). Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of the 16S-23S rRNA spacer region. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(8), 2988–2993. <https://doi.org/10.1128/aem.62.8.2988-2993.1996>
- Wei, W., Davis, R. E., Lee, I. M., & Zhao, Y. (2007). Computer-simulated RFLP analysis of 16S rRNA genes: Identification of ten new phytoplasma groups. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(8), 1855–1867. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.65000-0>