



XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



CARACTERIZACIÓN Y VARIABILIDAD INTRAGENÓMICA BASADA EN ARN RIBOSOMAL DE HONGOS ENDÓFITOS DE CÍTRICOS

Iván Rosas Hernández, Socorro Ramírez González, Claudia Patricia Larralde Corona y José A. Narváez Zapata. Instituto Politécnico Nacional (Laboratorio de Biotecnología Industrial, Centro de Biotecnología Genómica), Blvd. Del Maestro esq. Elías Piña, Col. Narciso Mendoza C.P. 88710 Reynosa (Tamaulipas) México. irosash0900@ipn.mx

Palabras clave: ARISA, cítricos, variabilidad-intragenómica.

Introducción. Los árboles de cítricos pueden exhibir una amplia variedad de enfermedades que impactan su salud, vigor y productividad. Estudios recientes han facilitado la identificación molecular de importantes agentes patógenos utilizando un amplio conjunto de metodologías moleculares, entre las cuales han sido propuestas la amplificación por PCR de la región 26S, secuenciamiento, SSCP (polimorfismo de cadena sencilla) y más recientemente ARISA (Análisis del espacio interribosomal automatizado). El presente trabajo busca la caracterización de organismos patógenos a plantas de cítricos así como la utilización de un banco de microorganismos para la localización de aquellos con capacidad antagonista.

Metodología. Un total de 39 cepas fúngicas fueron seleccionadas de una colección de 300 cepas, basados en sus características morfológicas contrastantes. Las cepas provienen de la parte interna del fruto de plantas de cítricos. Los aislados fúngicos fueron crecidos en medio Czapek–Dox por 3 días a temperatura ambiente, con agitación a 250 rpm. El ADN fue extraído usando la metodología de fenol-cloroformo. La identificación de los aislados fue conducida con el alineamiento de sus regiones ITS1–5.8S–ITS2ADNr y 26S ADNr con los cebadores ITS1 e ITS4 [1] y NL1/NL4 [2]. Los productos de PCR fueron secuenciados y alineados mediante el programa BLAST. La identificación de las secuencias fue apoyada por análisis de polimorfismos ribosomal mediante las técnicas de ARISA [3].

Resultados. La clasificación permite agrupar las 39 cepas fúngicas en los siguientes géneros: *Fusarium*, *Glomerella*, *Colletotrichum*, *Aspergillus*, *Nigrospora*, *Ascomycetes*, *Lasiodiplodia*, *Penicillium*, *Dothideomycetes*, *Pleurostoma* y *Exserohilum*. Los análisis mediante SSCP y ARISA demostraron la presencia de variabilidad intragenómica ribosomal, mostrando en la mayoría de los casos dos o más alelos del gen 26S (Fig. 1). Esta variabilidad fue marcada aun entre cepas genéticamente relacionadas dentro del género *Glomerella* (Figura 1c y 1b). La filogenia molecular no permite discriminar estas cepas. Los resultados de patogenicidad arrojan 4 grupos patogénicos, con las cepas CF-12, CF-39 previamente identificado como *Colletotrichum gloeosporioides* y CF-31 identificado como *Fusarium sp.*, con potencial mayor del

70%. Las cepas CF-21 (*Lasiodiplodia pseudotheobromae*) y CF-30 (*Nigrospora oryzae*) no mostraron ninguna patogenicidad durante las pruebas.

Conclusiones. El empleo combinado de la identificación molecular basada en ADNr por SSCP, ARISA o bien secuenciación directa indica una variabilidad intragenómica mayor de lo esperada. El empleo de este análisis combinado puede apoyar la correcta identificación de especies estrechamente relacionadas y con potencial comercial.

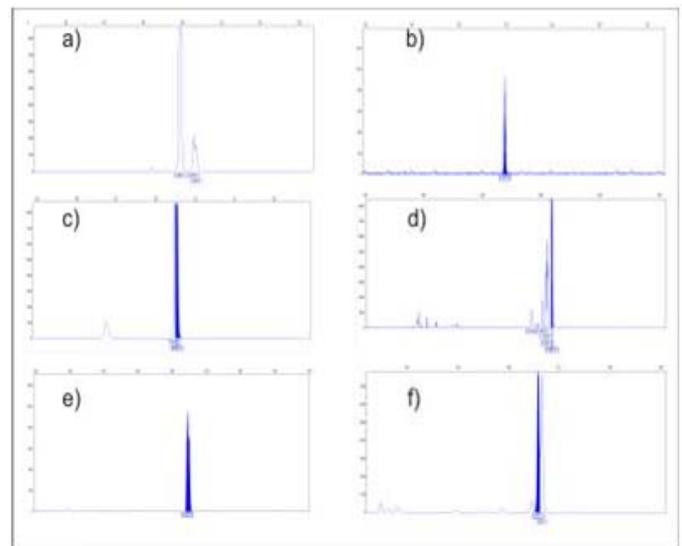


Figura 1. Alelos del gen 26S mediante ARISA en: a) *Penicillium sp.* CF-34 b) *Colletotrichum gloeosporioides* c) *C. gloeosporioides* (CF-14) d) *Lasiodiplodia pseudotheobromae* (CF-21) e) *Alternaria tenuissima*. (CF-18) f) *Dothideomycete ssp.* (CF-7).

Agradecimientos. El alumno I Rosas Hernández agradece el apoyo del Programa Institucional de Formación de Investigadores (PIFI). Este trabajo fue apoyado por el proyecto SIP20110241 y FORDECYT 2RO/2009/08/06-07 clave 11546.

Bibliografía

- White, T., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., 1990. In PCR Protocols, a Guide to Methods and Applications. 315- 322
- Schwieger, F., Tebbe, C. 1998. Applied and Environmental Microbiology. (64). 4870–4876
- García-Martínez, J., Acinas S., Antón, A., Rodríguez-Valera, F. 1999. Use of the 16S–23S ribosomal genes spacer region in studies of prokaryotic diversity. *Journal of Microbiological Methods* (36). 55–64.