



## Detección y caracterización molecular de un fitoplasma del grupo 16SrII asociado a la enfermedad de ‘escoba de bruja’ en cactus (*Opuntia* sp.)

Candelario Ortega-Acosta, Reyna Isabel Rojas-Martínez\*, Daniel L. Ochoa-Martínez, Manuel Silva-Valenzuela, Postgrado en Fitosanidad- Fitopatología, Colegio de Postgraduados Campus Montecillo. Km 36.5 Carretera México-Texcoco. Montecillo, Texcoco, Estado de México, México. C. P. 56264.

\*Autor de correspondencia:  
Reyna Isabel  
Rojas-Martínez  
rojas@colpos.mx

Sección:  
Edición periódica

Recibido:  
02 Octubre, 2023  
Aceptado:  
19 Febrero, 2024  
Publicado:  
06 Marzo, 2024

Cita:  
Ortega-Acosta C, Rojas-Martínez RI, Ochoa-Martínez DL y Silva-Valenzuela M. 2024. Detección y caracterización molecular de un fitoplasma del grupo 16SrII asociado a la enfermedad de ‘escoba de bruja’ en cactus (*Opuntia* sp.). Revista Mexicana de Fitopatología 42(2): 14. Revista Mexicana de Fitopatología 42(2): 14. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2310-2>



### RESUMEN

**Objetivo/Antecedentes.** Los fitoplasmas son patógenos obligados de plantas, tienen una fuerte especificidad con sus hospedantes, los síntomas típicos inducidos por estos patógenos incluyen reducción de crecimiento y declinamiento generalizado, entre otros, y rara vez ocasionan muerte de la planta. El objetivo de esta investigación fue determinar el fitoplasma asociado al síntoma de ‘escoba de bruja’ en un cactus ornamental (*Opuntia* sp.).

**Materiales y Métodos.** En cuatro viveros comerciales en Texcoco, Estado de México, se tomaron cuatro muestras de cactus ornamental con síntomas de ‘escoba de bruja’. Se realizó extracción de ADN de las muestras y se sometieron a PCR con iniciadores específicos para fitoplasmas (P1/P7 y R16F2n/R16R2). La determinación del fitoplasma en estudio se realizó por PCR, RFLP *in vitro*, secuenciación y análisis filogenético.

**Resultados.** De acuerdo con los diferentes análisis que se realizaron, se determinó que el fitoplasma asociado al nopal ornamental pertenece al subgrupo 16SrII-C.

**Conclusión.** Con base en los resultados obtenidos, se establece que un fitoplasma del subgrupo 16SrII-C está asociado con el síntoma de ‘escoba de bruja’ del cactus ornamental (*Opuntia* sp.).

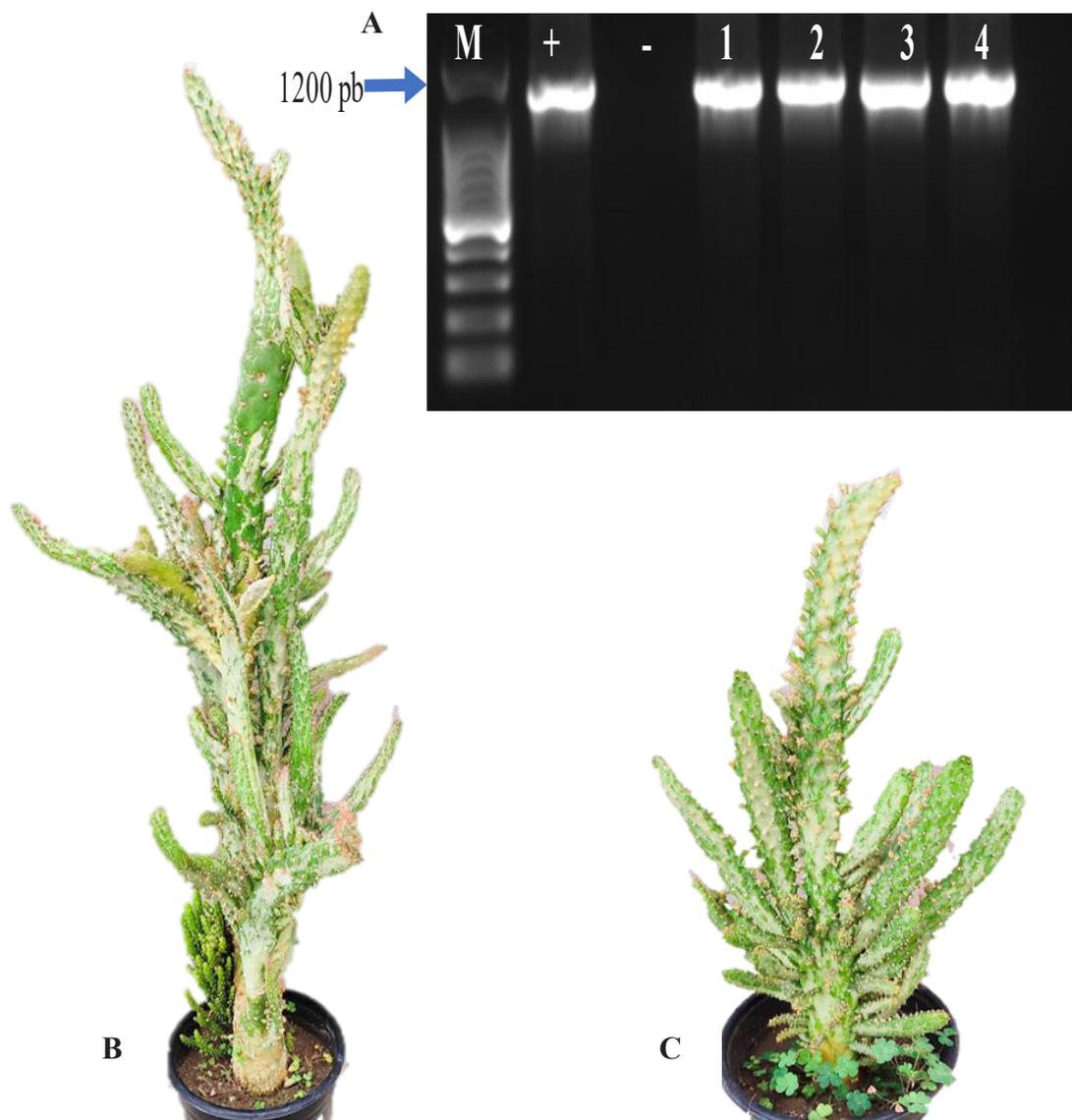
**Palabras clave.** deformación, patógenos no cultivables, RFLP *in vitro*.

## INTRODUCCIÓN

Diferentes cactus se han cultivado e introducido en algunas partes del mundo como ornamentales y comestibles. Los cactus son susceptibles a las infecciones por fitoplasmas y desarrollan enfermedades con síntomas caracterizados por un crecimiento en forma de escoba de bruja y patrones de mosaico verde en la epidermis (Cai *et al.*, 2008). El movimiento global de bulbos, esquejes y semillas de plantas de ornato y consumo humano ha permitido la introducción de nuevos patógenos a diversos nichos ecológicos (Miedaner y Garbelotto, 2024). Cuando la flora nativa es susceptible a un patógeno introducido puede dar lugar a una rápida declinación lo que puede ocasionar su extinción (Miedaner y Garbelotto, 2024). En los últimos años se han observado con mayor frecuencia plantas ornamentales con síntomas de fitoplasmas, patógenos con amplia plasticidad genética que les permite alojarse e infectar a cualquier tipo de planta, un ejemplo es '*Candidatus Phytoplasma asteris*', el cual se ha encontrado en más de 80 especies monocotiledóneas y dicotiledóneas en diferentes partes del mundo (Lee *et al.*, 2009). Los fitoplasmas son parásitos obligados de plantas e insectos y en la mayoría de los casos necesitan de ambos hospedantes para dispersarse en la naturaleza (Whitcomb y Tully, 1989), estas bacterias se caracterizan por tener un genoma pequeño, como consecuencia de esto, una limitada capacidad metabólica, por lo que forzosamente requieren de un insecto vector y una planta hospedante para reproducirse. Los fitoplasmas son patógenos que han colonizado ambos reinos: animal y vegetal, y los síntomas que inducen interfieren en el desarrollo de la planta ya que causan proliferación, virescencia y filodia, principalmente (Bertaccini, 2015).

Considerando la importancia de generar conocimiento científico de los patógenos emergentes con potencial de ser diseminados de manera fácil y eficiente por insectos vectores a cultivos de interés económico, es necesario conocer los diferentes grupos de fitoplasmas que pueden estar presentes en los cactus ornamentales que, por sus características fenotípicas se comercializan ampliamente en el centro de México, convirtiéndose en fuente de inóculo. Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue detectar e identificar al fitoplasma asociado a engrosamiento y proliferación de cladodios en un cactus ornamental.

**Detección de fitoplasmas.** Se obtuvieron cuatro muestras de nopal con síntoma de 'escoba de bruja' provenientes de cuatro viveros de Texcoco, Estado de México (Figura 1B-C). La extracción de ADN se realizó con el método CTAB 2 %, y la amplificación del ADNr ( $100 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ ) se realizó con iniciadores universales para fitoplasmas, P1 (5'-AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT-3') y P7 (5'-CGTCCTTCATCGGCTCTT-3') (Deng y Hiruki, 1991; Schneider *et al.*, 1995) que amplifican 1.8 kb, seguido de una segunda PCR (reacción anidada) con el par R16F2n (5'-GAAACGACTGCTAAGACTGG-3') y R16R2(5'-



**Figura 1.** A) Amplificaciones de ADNr 16S de fitoplasmas obtenidos con los iniciadores R16F2n/R16R2. Carril M; Marcador molecular 100 pb, carril +; ADN proveniente de *Dimorphotheca sinuata* infectada con “*Candidatus Phytoplasma asteris*” (16SrI-B), carril -; Control negativo, PCR sin template, carril 1-4; muestras de nopal (*Opuntia* sp.) con síntoma de ‘escoba de bruja’, proveniente de viveros ubicados en Texcoco, Estado De México; B-C) Síntomas de “escoba de bruja” en nopal ornamental.

TGACGGGCGGTGTGTACAAACCCCG-3’) (Gundersen y Lee, 1996) que amplifican 1.2 kb. Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador Techne® TC-300, con un protocolo de amplificación descrito previamente por Ortega-Acosta *et al.* (2019). Como control positivo se utilizó ADN de *Dimorphotheca sinuata*

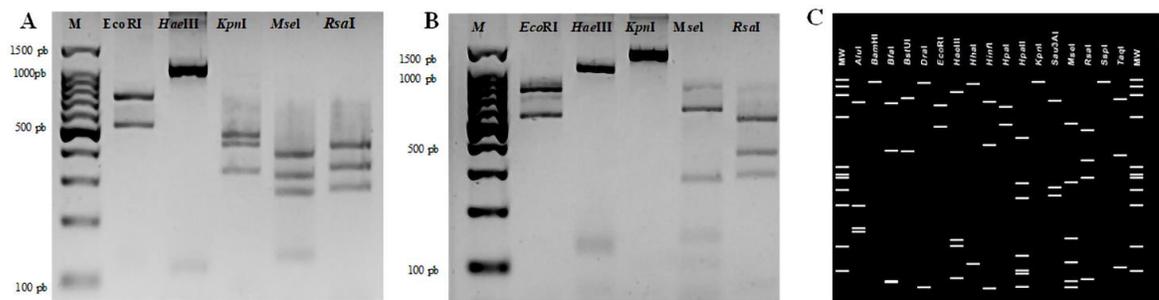
infectada con ‘*Candidatus Phytoplasma asteris*’ (16SrI-B). De la PCR anidada se cargaron 5 µL de producto amplificado y se observaron en un gel de agarosa 1 % teñido con bromuro de etidio y se visualizó en un transiluminador UV.

**Análisis de RFLP.** Aproximadamente 500 ng de cada uno de los productos obtenidos de la segunda PCR con los iniciadores R16F2n/R16R2 se sometieron a un análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP, por sus siglas en inglés) utilizando las siguientes enzimas de restricción; *RsaI*, *MseI* (Tru 91), *KpnI*, *EcoRI* (Promega, USA) y *HaeIII* (Sigma-Aldrich, USA) a 37 °C durante 4 h. Para este análisis solo se consideraron las enzimas claves que se utilizan para identificar grupos de fitoplasmas. El número y tamaño de los fragmentos resultantes se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa 3 %. Los patrones de restricción obtenidos se compararon con los publicados previamente (Lee *et al.*, 1998) y con los obtenidos en la herramienta *iPhyClassifier* de una cepa de referencia del subgrupo 16SrII-C (Zhao *et al.*, 2009).

**Secuenciación y análisis filogenético.** Los productos obtenidos de PCR anidada se purificaron, y se secuenciaron en ambas direcciones (Macrogen Inc. Corea) y posteriormente se generó un árbol filogenético con el método neighbor-joining en MEGA X (Kumar *et al.*, 2018) utilizando secuencias de diferentes grupos y subgrupos de fitoplasmas. En este caso, *Acheloplasma laidlawii* se utilizó como grupo externo.

Los resultados obtenidos indicaron la presencia de fitoplasmas en las cuatro muestras de cactus ornamentales con síntomas de ‘escoba de bruja’ (Figura 1A). La secuencia consenso obtenida en este estudio se depositó en el Banco de Genes del NCBI (National Center for Biotechnology Information) con el número de acceso 0N413680.1. El análisis BLAST de la secuencia, indicó 100 % de similitud con secuencias de cactus witches’ broom phytoplasma (grupo 16SrII, subgrupo C) (números de acceso MH644006-MH644007). El análisis de patrones electroforéticos con enzimas de restricción confirmó que el fitoplasma en estudio es miembro del subgrupo 16SrII-C (Figura 2B). Por otro lado, el perfil electroforético *in silico* de la cepa de referencia AJ293216.2 del subgrupo 16SrII-C (Figura 2C) que considera 17 enzimas de restricción, estuvo en concordancia con el resultado de RFLP obtenido con la digestión hecha en el laboratorio con las cinco enzimas clave que dan certeza del grupo al que pertenece determinado fitoplasma. El análisis filogenético ubicó al fitoplasma en estudio (0N413680), en el subgrupo 16Sr II-C (Figura 3).

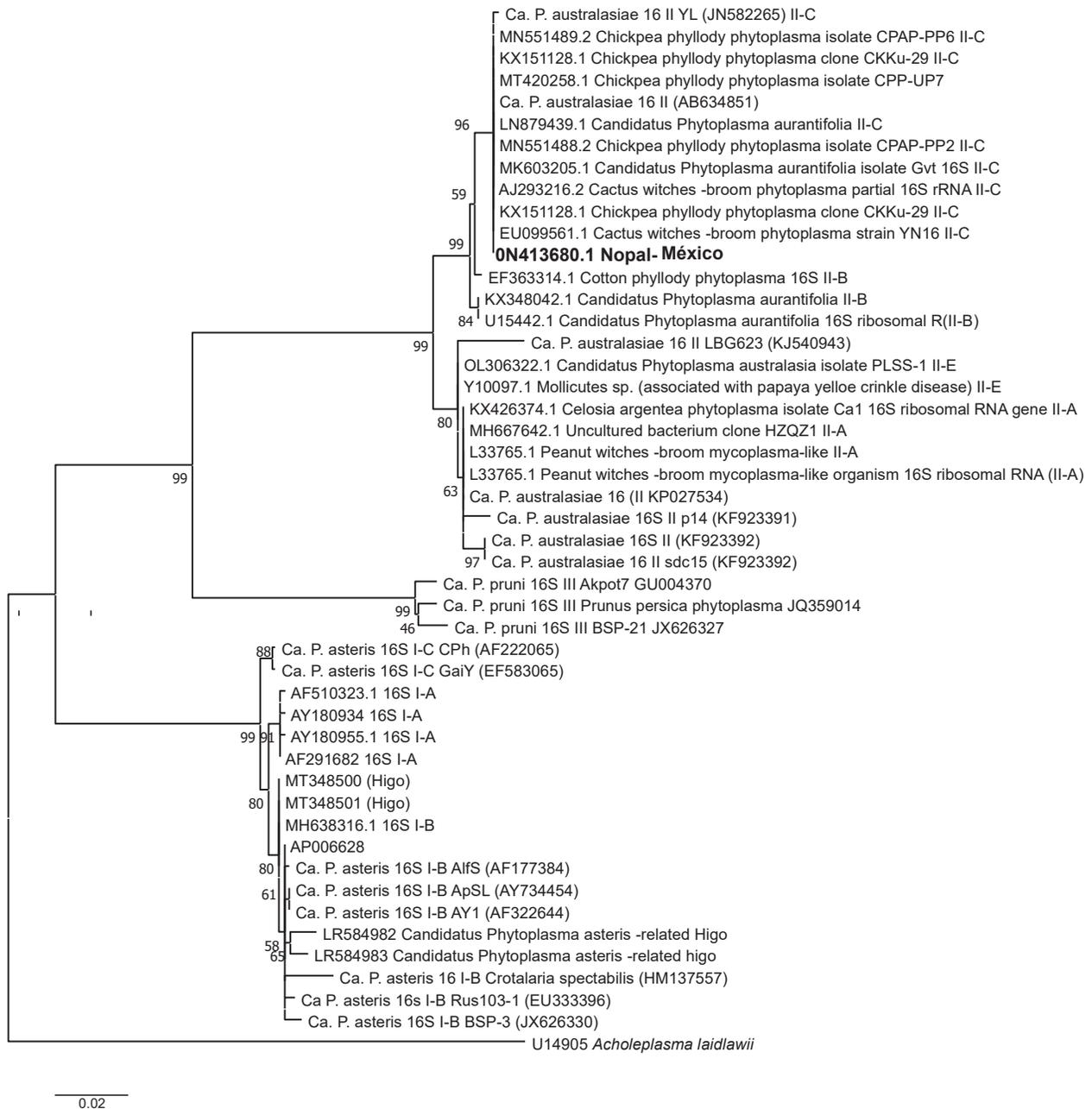
Los fitoplasmas requieren para su reproducción a diversos hospedantes, ya sean vegetales o insectos. Algunos insectos reportados como vectores de fitoplasmas son: *Macrosteles quadrilineatus*, *Haplaxius crudus*, *Dictyophara europaea*, *Euscelidius variegatus* y *Hyalesthes obsoletus*, entre otros (Alma *et al.*, 2019). En plantas



**Figura 2.** Análisis RFLP del ADNr 16S de fitoplasmas amplificado con los iniciadores R16F2n/R16R2 y digeridos con cinco enzimas de restricción: EcoRI, HaeIII, KpnI, MseI y RsaI M: marcador molecular 100 pb (Promega, USA); A) Control positivo ‘*Candidatus Phytoplasma asteris*’ (I-B); B) Muestra sintomática de nopal de este estudio (Número de acceso: 0N413680); C) Patrones de restricción *in silico*, generados a partir de las secuencias del gen DNAr 16S del Cactus witches’-broom phytoplasma 16SrII-C (Número de acceso: AJ293216.2) de los sitios de reconocimiento de 17 enzimas de restricción.

se encuentran en el floema, incluyendo las células inmaduras de este tejido que aún conservan sus núcleos mientras que en insectos vectores se localizan en diversos tejidos de manera intra o extracelular (Bertaccini *et al.*, 2014). En plantas ornamentales se han identificado 14 grupos de fitoplasmas de los 16 que existen, así como 30 subgrupos, todos ellos induciendo diferentes sintomatologías (Bellardi *et al.*, 2018). ‘*Candidatus Phytoplasma asteris*’ es el principal grupo que infecta especies ornamentales en todo el mundo. Hasta ahora, se ha informado que más de 60 especies de plantas ornamentales están infectadas con fitoplasmas en todo el mundo (Madhupriya, 2016).

Recientemente, se reportó en Turquía a ‘*Candidatus Phytoplasma aurantifolia*’-related strain (16SrII-B group) en un cactus ornamental que mostraba síntomas similares a los observados en las plantas de este estudio (Ayvaci *et al.*, 2021). En México se han reportado varios grupos de fitoplasmas asociados al nopal tunero que tienen “engrosamiento del cladodio” o “planta macho”, enfermedad más importante en este cultivo ya que disminuye significativamente la producción en todas las zonas nopaleras del país (Hernández-Pérez *et al.*, 2009; Suaste *et al.*, 2012; Aguilar, 2019). Los síntomas de esta enfermedad consisten en un amarillamiento parcial de la planta, reducción gradual del tamaño de la penca y fruto, engrosamiento y desarrollo cordiforme del cladodio, así como la inhibición de la brotación vegetativa y floral; en etapas finales se detiene la producción de la planta sin que ésta muera. En esta sintomatología se han encontrado asociados a diferentes grupos de fitoplasmas, entre los que se encuentran el 16SrII (Hernández-Pérez *et al.*, 2009), 16SrI (‘*Candidatus Phytoplasma asteris*’) (Zak *et al.*, 2011), 16SrXIII (Suaste *et al.*, 2012) y al 16SrVI (‘*Candidatus Phytoplasma trifolii*’) (Aguilar, 2019). A pesar de la amplia distribución geográfica de los fitoplasmas, su gama de hospedantes e



**Figura 3.** Árbol filogenético construido por el método de neighbor-joining con secuencias del ADNr 16S depositadas en el Banco de Genes, se muestra la relación entre los fitoplasmas del grupo 16SrI y 16SrII con el fitoplasmas que induce ‘escoba de bruja’ en nopal (*Opuntia* sp.) (Número de acceso: 0N413680.1). La barra indica el número de sustituciones por nucleótidos.

importancia como microorganismos fitopatógenos, existe poco entendimiento sobre las rutas de defensa que tiene la planta para evitar su establecimiento, lo cual puede dar lugar a estrategias alternativas para su manejo y así disminuir su impacto en la agricultura. Por otro lado, en México existen normas que regulan el establecimiento y movilidad de este tipo de ornamentales como la Ley General de Vida Silvestre (2000) y la Norma Oficial Mexicana de Protección a Especies Nativas de México de Flora y Fauna Silvestre (2002). Asimismo, la comercialización internacional de cactáceas está regulada por la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (2008). Respecto a los recursos fitogenéticos para la agricultura y la alimentación contamos con la Ley Federal de Producción, Certificación y Comercio de Semillas (2007). En la comercialización, el uso de signos distintivos está regulado en el ámbito internacional por los Acuerdos sobre Derechos de Propiedad Intelectual y Comercio en la Organización Mundial de Comercio y en México a diferencia de otros países se ha permitido que estos patógenos se establezcan en diferentes especies de cactáceas ornamentales, los cuales se pueden convertir en una fuente importante de inóculo para otros cultivos, aunado a esto, tampoco se conocen los insectos vectores que pueden estar involucrados en su transmisión hacia otros cultivos de importancia agrícola.

Por otro lado, la ventaja que se tiene ahora para identificar con criterios filogenéticos y moleculares permite de manera precisa conocer la asociación de más de un fitoplasma en hospedantes con la misma o diferente sintomatología, o bien, los síntomas ocasionados por un solo grupo de fitoplasmas como el 16SrI. Esto ha permitido que el concepto de enfermedad en el caso de los fitoplasmas esté cambiando; en muchos de los casos se indica que las propiedades biológicas características de un determinado fitoplasma están vinculadas con un grupo o subgrupo establecido con criterios filogenéticos, por lo que estas propiedades biológicas solo se pueden utilizar como criterios secundarios para considerar a un fitoplasma como agente causal de una enfermedad.

Con base en los resultados obtenidos, se establece que un fitoplasma del subgrupo 16SrII-C está asociado con el síntoma de ‘escoba de bruja’ de un cactus ornamental (*Opuntia* sp.).

## LITERATURA CITADA

- Aguilar PNY. 2019. Manejo integrado del engrosamiento del cladodio en tres cultivares de nopal tunero en Teotihuacán, Estado de México. Tesis de Doctorado en Ciencias. Colegio de Postgraduados, México.
- Alma A, Lessio F and Nickel H. 2019. Insects as Phytoplasma Vectors: Ecological and Epidemiological Aspects. *In: Bertaccini A, Weintraub P, Rao G, Mori N. (eds) Phytoplasmas: Plant Pathogenic Bacteria - II. Springer, Singapore.* [https://doi.org/10.1007/978-981-13-2832-9\\_1](https://doi.org/10.1007/978-981-13-2832-9_1)

- Ayvaci H, Simsek E, Akkurak H, Dikilitas M and Guldur ME. 2021. First report of a ‘*Candidatus* Phytoplasma aurantifolia’-related strain associated with Cactus witches’ broom disease in *Opuntia* sp. in Turkey. *New Disease Report* 44(1). <https://doi.org/10.1002/ndr.12031>
- Bellardi MG, Bertaccini A, Rao GP and Madhupriya. 2018. Phytoplasma diseases in ornamental crops. In: Rao GP, Bertaccini A, Fiore N, Liefting LW (eds) *Phytoplasmas: Plant Pathogenic Bacteria-I. Characterization and Epidemiology of Phytoplasma Associated Diseases*, Springer, Singapore. 191–233 pp.
- Bertaccini A. 2015. Phytoplasma research between past and future: what directions? *Phytopathogenic Mollicutes* 5:S1–S4
- Bertaccini A, Duduk B, Paltrinieri S and Contaldo N. 2014. Phytoplasmas and phytoplasma diseases severe threat to agriculture. *American Journal of Plant Sciences* 5:1763-1788. <http://dx.doi.org/10.4236/ajps.2014.512191>
- Cai H, Wei W, Davis RE, Chen H and Zhao Y. 2008. Genetic diversity among phytoplasmas infecting *Opuntia* species: virtual RFLP analysis identifies new subgroups in the peanut witches’-broom phytoplasma group. *Int J Syst Evol Microbiol* 58:1448–1457
- Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres. 2008. <https://cites.org/esp/disc/text.php> (consulta, agosto 2023).
- Deng S and Huriki. 1991. Amplification of 16Sr RNA genes from culturable and nonculturable mollicutes. *Journal Microbiological Methods* 14:53-61
- Gundersen DE and Lee I-M. 1996. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested- PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathology Mediterranean* 35:114–51. <https://www.jstor.org/stable/42685262>
- Hernández-Pérez R, Noa-Carrazana JC, Gaspar R, Mata P and Flores-Estévez N. 2009. Detection of Phytoplasma on Indian Fig (*Opuntia ficus-indica* Mill) in Mexico Central Region. *OnLine Journal of Biological Sciences* 9(3): 62-66. <https://doi.org/10.3844/ojbsci.2009.62.66>
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C and Tamura K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35(6):1547-1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Lee IM, Gundersen-Rindal DE, Davis R E and Bartoszyk MI. 1998. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48: 1153-1169. <https://pubag.nal.usda.gov/download/26444/PDF>
- Lee S, Han S and Cha B. 2009. Mixed infection of 16S rDNA I and V groups of phytoplasma in a single jujube tree. *The Plant Pathology Journal* 25: 21–25. <https://doi.org/10.5423/PPJ.2009.25.1.021>
- Ley Federal de Producción, Certificación y Comercio de Semillas. 2007. [https://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/pdf/LFPCCS\\_110518.pdf](https://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/pdf/LFPCCS_110518.pdf) (consulta, agosto 2023).
- Ley general de vida silvestre. 2000. [https://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/pdf/146\\_200521.pdf](https://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/pdf/146_200521.pdf). (consulta, agosto 2023).
- Madhupriya. 2016. Molecular characterization of phytoplasmas associated with important ornamental plant species in Northern India. Thesis submitted at Amity University, Haryana
- Miedaner T and Garbelotto M. 2024. Human-mediated migration of plants, their pathogens and parasites. *Journal of Plant Pathology*. <https://doi.org/10.1007/s42161-024-01589-0>
- Norma Oficial Mexicana de Protección a Especies Nativas de México de Flora y Fauna Silvestre 2002. [https://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=735036&fecha=06/03/2002#gsc.tab=0](https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=735036&fecha=06/03/2002#gsc.tab=0) (consulta, agosto 2023).
- Ortega-Acosta C, Ochoa-Martínez DL, Rojas-Martínez RI, Gutiérrez-Gallegos JA. 2019. Phyllody of daisy (*Dimorphotheca sinuata*) associated to ‘*Candidatus* phytoplasma asteris’. *Revista Mexicana de Fitopatología* 37(3): 444–453. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1905-3>
- Schneider B, Seemüller E, Smart CD and Kirkpatrick BC. 1995. Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas. In: Razin S, Tully JG (eds) *Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology*. Academic Press, San Diego
- Suaste-Dzul A, Rojas-Martínez RI, Zavaleta-Mejía E and Pérez-Brito D. 2012. Detección molecular de fitoplasmas en nopal tunero (*Opuntia ficus-indica*) con síntomas de engrosamiento del cladodio. *Revista Mexicana de Fitopatología* 30:1-9. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61225129007>
- Whitcomb R and Tully E. 1989. *The Mycoplasmas Vol. V*. San Diego: Academic Press, Inc.

- Zak LF, Yáñez-Morales MJ, Alanis-Martínez I and González-Pérez E. 2011. New hosts of 16SrI phytoplasma group associated with edible *Opuntia ficus-indica* crop and its pests in Mexico. *African Journal of Microbiology Research* 5:910-918
- Zhao Y, Wei W, Lee IM, Shao J, Suo X and Davis RE. 2009. Construction of an interactive online phytoplasma classification tool, iPhyClassifier, and its application in analysis of the peach X-disease phytoplasma group (16SrIII). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59:2582-93. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.010249-0>