

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE FITOPLASMAS EN EL CULTIVO DE BRÓCOLI (*Brassica oleracea*) EN AGUASCALIENTES, MÉXICO

LUIS ROBERTO REVELES-TORRES, SILVIA SALAS-MUÑOZ
RODOLFO VELÁSQUEZ-VALLE, ARMANDO MAURICIO-CASTILLO



**SECRETARÍA DE AGRICULTURA, GANADERÍA,
DESARROLLO RURAL, PESCA Y ALIMENTACIÓN**

LIC. BALTAZAR HINOJOSA OCHOA
Secretario

MVZ. JORGE LUIS ZERTUCHE RODRÍGUEZ
Subsecretario de Agricultura

LIC. RAÚL ENRIQUE GALINDO FAVELA
Subsecretario de Desarrollo Rural

ING. IGNACIO LASTRA MARÍN
Subsecretario de Alimentación y Competitividad

**INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES
FORESTALES, AGRÍCOLAS Y PECUARIAS**

DR. JOSÉ FERNANDO DE LA TORRE SÁNCHEZ
Director General

DR. RAÚL G. OBANDO RODRÍGUEZ
Coordinador de Investigación, Innovación y Vinculación

M. C. JORGE FAJARDO GUEL
Coordinador de Planeación y Desarrollo

MTRO. EDUARDO FRANCISCO BERTERAME BARQUÍN
Coordinador de Administración y Sistemas

CENTRO DE INVESTIGACIÓN REGIONAL NORTE CENTRO

DR. ARTURO DANIEL TIJERINA CHÁVEZ
Director Regional

DR. FRANCISCO JAVIER PASTOR LÓPEZ
Director de Investigación

ING. RICARDO CARRILLO MONSIVÁIS
Director de Administración

MC. RICARDO ALONSO SÁNCHEZ GUTIERREZ
Director de Coordinación y Vinculación en Zacatecas

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE FITOPLASMAS EN EL CULTIVO DE BRÓCOLI (*Brassica oleracea*) EN AGUASCALIENTES, MÉXICO

Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias

Progreso No. 5, Barrio de Santa Catarina

Delegación Coyoacán

México, D.F.

C.P. 04010 México, D.F.

Teléfono (55) 3871-8700

ISBN: 978-607-37-1054-1

Primera Edición: Noviembre 2018

No está permitida la reproducción total o parcial de esta publicación, ni la transmisión de ninguna forma o por cualquier medio, ya sea electrónico, mecánico, fotocopia o por registro u otros métodos, sin el permiso previo y por escrito a la institución.

Cita correcta:

Reveles-Torres L.R., Salas-Muñoz, S., Velásquez-Valle R. y Mauricio-Castillo J.A. 2018. Identificación molecular de fitoplasmas en el cultivo de brócoli (*Brassica oleracea*) en Aguascalientes México. Folleto Técnico Núm 95. Campo Experimental Zacatecas. CIRNOC – INIFAP, 37 páginas.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
El brócoli (<i>Brassica oleracea</i>)	4
Fitoplasmas, agentes patogénicos	5
Transmisión	6
Sintomatología.....	7
Detección e identificación de fitoplasmas	8
MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
Identificación sintomática de fitoplasmas en brócoli	9
Diagnóstico molecular para fitoplasmas	11
Identificación de fitoplasmas.....	12
RESULTADOS.....	13
Material biológico recolectado	13
Diagnóstico molecular de fitoplasmas	19
Análisis filogenético	23
DISCUSIÓN	25
CONCLUSIONES	31
LITERATURA CITADA.....	32

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE FITOPLAMAS EN EL CULTIVO DE BRÓCOLI (*Brassica oleracea*) EN AGUASCALIENTES MÉXICO

Luis Roberto Reveles-Torres¹

Silvia Salas-Muñoz²

Rodolfo Velásquez Valle¹

J. Armando Mauricio Castillo³

INTRODUCCIÓN

México ha sido un importante productor de un gran número de alimentos para consumo humano, destacando la producción de las hortalizas que incluye las verduras y las legumbres verdes. Algunas de las hortalizas con mayor importancia en México son las de la familia de las Crucíferas. Uno de los principales productores de brócoli en nuestro país es el estado de Guanajuato, con una producción de 30 mil de las 40 mil hectáreas sembradas en el país, lo que representan el 60% del total nacional, seguido de los estados de Aguascalientes, Puebla, Querétaro y Zacatecas (Flores y Andrade, 2015). De ello, hace que el brócoli sea una de las hortalizas más importantes en cuanto a la economía del país. Sin embargo, al igual que todos los cultivos, estos se ven

¹ Investigadores del Programa de Biología Molecular, y del Programa de Fitopatología del Campo Experimental Zacatecas. ² Investigador Catedrático CONACYT-Campo Experimental Zacatecas. ³ Docente-Investigador de la Unidad Académica de Agronomía UAZ.

afectados por varios factores que inducen enfermedades, entre los cuales está la infección por la presencia de organismos fitopatógenos. Éstos provocan en las plantas, una serie de alteraciones fisiológicas y morfológicas que manifiestan una sintomatología determinada, provocando que el rendimiento y productividad del cultivo se vea negativamente afectado.

La aparición de estas enfermedades es causada por la inoculación de microorganismos por parte de insectos vectores. En los últimos años, la aparición de fitoplasmas en las áreas de cultivo ha sido cada vez más insistente.

Esta problemática ha llamado la atención de productores e investigadores, ya que no solo afecta la productividad del cultivo, sino que también puede afectar el entorno y ser éste, el reservorio permanente de los vectores; hecho que se ha demostrado ya que, en los últimos años, se ha detectado la presencia de fitoplasmas afectando a diversos cultivos, tales como tomate (Fierro, 2009), chile (Aredondo-Pérez *et al.*, 2013), frijol (Zamora *et al.*, 2012), nopal (Tessitori *et al.*, 2006), tomatillo

(Mauricio-Castillo *et al.*, 2018), ajo (Reveles-Torres *et al.*, 2018), por citar algunos.

Los síntomas más frecuentemente asociados con la infección por fitoplasmas son: enanismo, hojas anormalmente pequeñas, modificadas y cloróticas, inflorescencia con filodia y desarrollo excesivo de raíces secundarias.

En la actualidad, la técnica más versátil para la detección de fitoplasmas, es la identificación molecular por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa anidada (PCRn), seguido de los análisis de longitud del polimorfismo de los fragmentos de restricción (RFLPs) y electroforesis en gel. Estos métodos potencialmente pueden detectar y diferenciar los fitoplasmas. La sensibilidad de la detección precisa de estos microorganismos es un requisito previo para el manejo de las enfermedades asociadas a fitoplasmas. El diagnóstico usando esta técnica se basa principalmente en secuencias específicas que tiene este grupo microbiano dentro del gene 16S rRNA (Lee *et al.*, 1993).

Dado que el brócoli es una hortaliza económicamente importante, el objetivo del presente

trabajo consistió en identificar el o los fitoplasmas presentes en este cultivo de las plantas encontradas en el estado de Aguascalientes con la sintomatología de fitoplasmosis.

El brócoli (*Brassica oleracea*)

Es una de las especies más importantes de la familia Cruciferae junto con el repollo y la coliflor. En México según SAGARPA, la producción de brócoli (*Brassica oleracea* var. *Itálica*) se localiza principalmente en el estado de Guanajuato, donde se confina el 62% de la superficie cosechada a nivel nacional; el 57.8% de la producción total del país es obtenida en esa región representando el 46% del valor de la producción nacional; el rendimiento promedio en esa área es de 12.2 t/ha. Los estados de Michoacán, Puebla, Jalisco, Sonora y Baja California también destacan en la producción de esa hortaliza. Los estados de Zacatecas, Michoacán, San Luis Potosí, Aguascalientes y Querétaro, todos ellos vecinos del de Guanajuato, han conformado un clúster industrial de producción y procesado de vegetales, destacando el

brócoli como uno de los productos principales de dicho agrupamiento estratégico (SIAP, 2014).

De acuerdo a la comunidad científica el brócoli y la coliflor, ocupan el primer y tercer lugar, respectivamente con respecto a su contenido nutrimental (FAO, 2007). Ya que debido a la tendencia actual de las demandas del mercado internacional y a las necesidades de salud mundial, estos productos hortícolas pueden satisfacer las necesidades de orden nutricional que contribuyen a mantener la salud.

Fitoplasmas, agentes patogénicos

Las enfermedades causadas por organismos parecidos a micoplasmas (MLO), ahora denominados fitoplasmas, se consideraban causadas por virus con características poco usuales hasta que Doi y colaboradores (1967) demostraron la presencia de células procariotas tipo micoplasmas en el floema de plantas infectadas con el enanismo, escoba de bruja, filodia y virescencia, sintomatología denominada como amarillamiento del aster.

Fue hasta el año de 1994, que el Comité de Taxonomía de los Mollicutes de la IOM (International Organization for Mycoplasmaology, por su nombre en inglés) estableció el nombre actual de Fitoplasma (Hooker, 1981). Estos organismos se encuentran en las células cribosas del floema y aparentemente en raras ocasiones en células del parénquima floemático de las plantas infectadas (Doi *et al.*, 1967).

Los fitoplasmas carecen de pared celular, característica que les confiere un pleomorfismo; por lo que al carecer de esta estructura celular son resistentes a sustancias antibacterianas, como la penicilina, que inhiben la síntesis de peptidoglicano. Sin embargo, son sensibles a las tetraciclinas que actúan inhibiendo la síntesis de proteínas (Tran-Nguyen y Schneider, 2013).

Transmisión

Los fitoplasmas se transmiten por medio de insectos vectores pertenecientes al orden de los Homópteros (familias Cicadellidae, Cixidae, Cercopidae, Psyllidae y Fulgoridae) (Weintraub y Jones, 2010), con multiplicación persistente en el insecto. Y aunque

normalmente no se transmiten de generación en generación, se ha podido demostrar la transmisión vertical del fitoplasmas en los vectores *Scaphoideus titanus* Ball (Alma *et al.*, 1997) y *Matsumuratettix hiroglyphycus*, Matsumura (Hanboonsong *et al.*, 2002) respectivamente.

Sintomatología

Por mucho tiempo la enfermedad fue considerada de etiología viral y tiempo después, se reveló que era causada por fitoplasmas, los cuales dañan cerca de 1000 especies de plantas, entre ellas, una amplia variedad de cultivos, económicamente importantes.

Generalmente, la enfermedad asociada a los fitoplasmas se reconoce por un conjunto de síntomas, que reflejan alteraciones en el equilibrio hormonal de la planta, en la fotosíntesis y en las sustancias de reserva (Pertot *et al.*, 1998). Estos síntomas son: amarillamiento, clorosis, enrojecimiento precoz de las hojas, esterilidad de las flores, virescencia (los pétalos adoptan un color verde), filodia (sustitución de los órganos florales por estructuras foliares), proliferación de yemas adventicias dando lugar a

“escobas de bruja”, enanismo generalizado, desarreglos vegetativos, enrollamientos de hojas, y decaimiento general (Musetti *et al.*, 2000). Sin embargo, los síntomas de virescencia, filodia y escoba de bruja, no solamente son exclusivos de fitoplasmas, sino que también estos síntomas son causados por espiroplasmas, los cuales también son microorganismos que al igual que los fitoplasmas, habitan en el floema de las plantas y se transmiten por alimentación de los vectores (Swisher *et al.*, 2016).

Detección e identificación de fitoplasmas

Tradicionalmente los fitoplasmas eran diferenciados y caracterizados con base en sus propiedades biológicas, el rango de hospederos, los síntomas de la enfermedad en los hospederos naturales y la especificidad de los insectos vectores. Los fitoplasmas pueden alcanzar altos títulos de concentración “titers” (por sus siglas en inglés), al multiplicarse, sin embargo, en las fases muy tempranas de la adquisición-incubación, los títulos de fitoplasmas en el insecto, pueden ser tan bajos que, incluso, las herramientas sensibles de diagnóstico

molecular pueden fallar en la detección del patógeno (Bosco y Tedeschi, 2013).

La técnica más actual para su diagnóstico es por técnicas moleculares, específicamente por PCR anidada (Reveles-Torres *et al.*, 2014).

MATERIALES Y MÉTODOS

Identificación sintomática de fitoplasmas en brócoli

Fueron colectadas 23 plantas con la sintomatología de presencia de fitoplasmas, y 10 sanas aparentemente sanas. Ambas muestras se tomaron en una parcela agrícola cuyas coordenadas son: 22°06'44.9 latitud norte y 102°16'59.3 longitud oeste del municipio de San Francisco de los Romo, Aguascalientes, México. Estas plantas tenían síntomas de hojas cloróticas, enanismo, raíces pronunciadas, presencia de filodia y tallo prominente. También se colectaron plantas aparentemente sanas, cuidando que las inflorescencias estuvieran enteras, frescas, limpias, bien formadas, de flores cerradas y de coloración típica.

Además, se observó y contabilizó la incidencia de sintomatología en el cultivo de brócoli por “camas” y en

cada una de ellas había alrededor de 500 plantas y de esas al menos 100 tenían síntomas producidos por fitoplasmas siendo las de más incidencia, las plantas con filodia y hojas cloróticas.

Las plantas colectadas fueron llevadas al laboratorio de Diagnóstico Molecular en Sanidad Vegetal del Campo Experimental Zacatecas del INIFAP, para su diagnóstico molecular.

Para la detección de cualquier agente fitopatógeno, lo primero que se debe de realizar es la extracción del ADN total del tejido vegetal enfermo. De 23 plantas de brócoli con la sintomatología observada, se tomó una muestra de los tejidos de hojas, tallo, raíz e inflorescencias de cada planta para tener una muestra vegetal mixta de 5 gramos, los cuales se maceraron en nitrógeno líquido en un mortero frío, y posteriormente se colocó la muestra pulverizada en un tubo eppendorf de 1.5 ml y se procedió a la extracción de ADN con el método de [Dellaporta y colaboradores \(1983\)](#).

Diagnóstico molecular para fitoplasmas

Después de la extracción del ADN total del tejido de las plantas de brócoli se realizó el diagnóstico molecular de fitoplasmas bajo PCR con los oligonucleótidos P1 (5'-AAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG GAT T-3' y Tint (5'-TCA GGC GTG TGC TCT AAC CAG C- 3') (Smart *et al.*, 1996), y después una reamplificación anidada a partir de un fragmento de 1,250 pb aproximadamente con los oligonucleótidos R16F2n (5'-GAA ACG ACT GCT AAG ACT GG-3' y 5'-TGA CGG GCG GTG TGT ACA AAC CCC G-3') (Gundersen y Lee, 1996).

Los programas del termociclador fueron 94°C/5 minutos, 35 ciclos (94°C/1minuto, 56°C/1minuto,72°C/2 minutos), y de extensión final a 72°C /5 minutos. El programa para la reamplificación fue a 94°C/5 minutos, 35 ciclos (94°C/1minuto, 55°C/1minuto, 72°C/2 minutos), y extensión final a 72°C /5 minutos.

Los productos de PCR fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa al 1% y se visualizan por tinción con bromuro de etidio e iluminación UV, y fueron fotodocumentados.

Identificación de fitoplasmas

Los productos de PCR de las muestras de las plantas de brócoli que resultaron positivas para el ADN de fitoplasmas, se clonaron (ligaron) en el vector pGEM®-T Easy (Promega Corporation), y se transformaron en células competentes de *Escherichia coli* mediante choque térmico. Después, las clonas positivas se sometieron a digestión con la enzima EcoRI, con la finalidad de liberar el fragmento clonado que corresponde al gen 16S ribosomal de fitoplasma. Posteriormente, las clonas positivas fueron sometidas a un análisis de RFLP con las enzimas de restricción HinfI y EcoRI (New England BioLabs™), para identificar bandas polimórficas. Las clonas seleccionadas fueron secuenciadas en el Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (LANBAMA) en San Luis Potosí, México.

Con las secuencias obtenidas, se realizó análisis *in silico* donde éstas, se exportaron a los programas virtuales de análisis de RFLP de la web iPhyClassifier (<http://plantpathology.ba.ars.usda.gov/cgi-bin/resource/iphyclassifier.cgi>) para la restricción de la digestión simulada por ordenador y el trazado de gel

virtuales (Zhao *et al.*, 2009). Cada fragmento de ADN fue digerido y alineado *in silico* con 17 enzimas de restricción diferentes que han sido utilizadas de forma rutinaria para el análisis de los RFPLs del gen ADNr 16s (Lee *et al.*, 1998). Después de la digestión de restricción *in silico*, una imagen de electroforesis en gel de agarosa al 3% virtual fue trazada y capturado como un archivo PDF. Las secuencias de análisis RFLP de los aislamientos de fitoplasmas se compararon de forma automática para el reconocimiento de grupo y subgrupo de fitoplasmas 16s.

RESULTADOS

Material biológico recolectado

Fueron colectadas plantas de brócoli que tuvieran la siguiente sintomatología propia por infección a fitoplasmas: crecimiento reducido, hojas anormalmente pequeñas, modificadas y cloróticas (Figura 1), inflorescencia con filodia (Figura 2), raíz con exceso de raíces secundarias (Figura 3), plantas con doble tallo (Figura 4) y/o con mucha producción de hojas (Figura 5), además de las plantas aparentemente sanas (Figura 6).

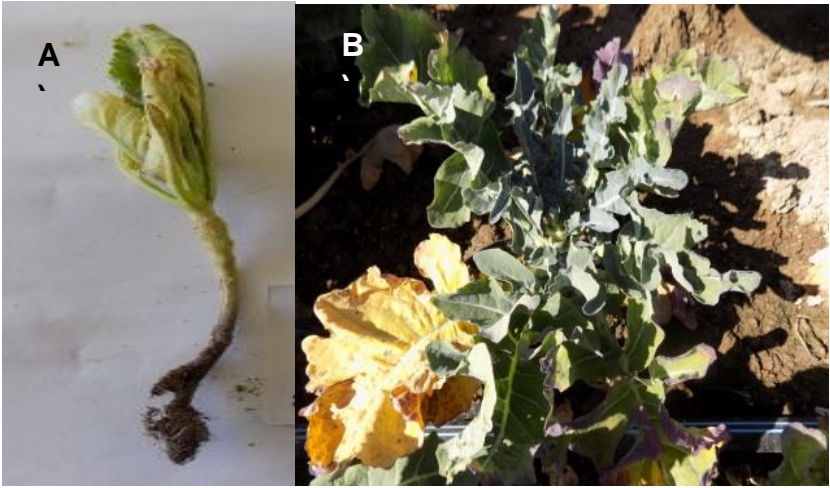


Figura 1. Fotografías con la sintomatología encontrada en la parcela de brócoli, en el estado de Aguascalientes. México. A) planta con crecimiento reducido, B) hojas anormalmente pequeñas, modificadas y cloróticas.



Figura 2. Planta de brócoli mostrando inflorescencias, sintomatología conocida como filodia.



Figura 3. Raíz de una planta de brócoli donde se aprecia un exceso de raíces secundarias.



Figura 4. Planta de brócoli mostrando un doble tallo.



Figura 5. Planta de brócoli con producción excesiva de hojas



Figura 6. Planta de brócoli aparentemente sana.

En la Tabla 1 se muestran las sintomatologías registradas en cada una de las 25 muestras. En esta, se puede apreciar que, de ellas, 11 tuvieron síntomas de enanismo, presentaron filodia 13 plantas (56.5%) así como inflorescencias de tamaño mediano, e inclusive tres carecían de ésta. El tamaño del tallo fluctuó desde grande (17.4%), mediano (43.5%), y pequeño (34.8%). Por otra parte, las hojas variaron mucho en tamaño, pues la mayoría tuvo hojas pequeñas (65%), aunque también las plantas presentaban hojas medianas y grandes (22%). Con respecto a la raíz, el 43.5% tuvo poco desarrollo radicular y el 47.8% con desarrollo normal.

Tabla 1. Sintomatología de plantas de brócoli relacionada con la presencia de fitoplasmas.

Características de las muestras de plantas de Brócoli						
	Altura	Inflorescencia	Tallo	Hoja		Raíz
				Tamaño	Color	
1	E	NP	P	P	Am	Po
2	E	P, Mo	P	P	Am, y V	Po
3	E	P	P	P	Am, y V	Po
4	E	P	P	P y M	Mo	Po
5	E	NP	P	P	Mo y V	Po
6	N	P, F	M	M	Am y V	N
7	N	M, F	M	P y M	Am y V	N
8	N	M, F	M	P y M	Am y V	N
9	N	M	M	P y M	V	M
10	E	MP	P	P y M	Mo y V	Po
11	E	MP	NP	P	V	NP
12	E	NP	P	P	Am	Po
13	E	NP	P	P	Am	Po
14	N	M, F	M	M	Am y V	Po
15	N	M, F	M	P y M	Am y V	N
16	N	M, F	M	P y M	V	N
17	N	M, F	M	P y M	V	Po
18	N	N, F	G	M y G	V	N
19	N	N, F	M	M	V	N
20	N	M, F	G	M y G	Am y V	N
21	N	M, F	M	M y G	Am y V	N
22	N	M, F	G	M y G	Am y V	N
23	N	P, F	G	M y G	Am y V	N

E: Enanismo, NP: No Presento, G: Grande, M: Mediana, P: Pequeña, N: Normal, Ch: Chica, F: Filodia, Mo: Morado, Am: Amarilla, V: Verde, Po: Poco.

Diagnóstico molecular de fitoplasmas

Para la detección de fitoplasmas mediante PCR, los resultados obtenidos fue que tres muestras de las 23 analizadas resultaron positivas para la presencia de fitoplasma en brócoli. En la Figura 7, se muestra la amplificación de un fragmento de 1,250 pb, en las muestras 13, 21 y 23, el cual corresponde a la presencia de fitoplasmas.

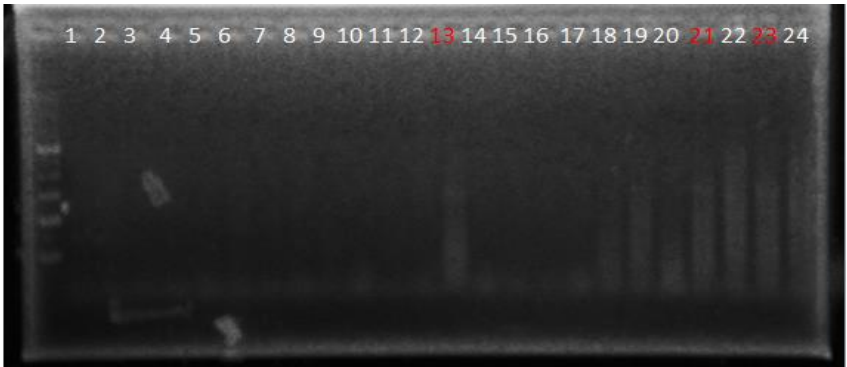


Figura 7. Identificación de fitoplasmas mediante la PCR anidada en plantas de brócoli. Carril M: Marcador de peso Molecular 1 kb, Carriles 1-10: muestras de plantas de brócoli, Carril 11: Control negativo y Carril 12: Control positivo.

Los productos de la PCR anidada de las tres muestras que dieron positivo para fitoplasmas fueron ligados en un vector de clonación pGEM-T Easy Vector System

(Promega Corporation) y se transformaron por el método de choque térmico en células competentes de *Escherichia coli* TOP10.

Después de la transformación de cada una de las ligaciones (13, 21 y 23), se extrajo el ADN plasmídico de las colonias blancas mediante la técnica de *minipreps*. En la Figura 8, se muestra el gel de calidad de la extracción de los ADN plasmídico de las ligaciones 13, con número de clonas 1, 2, 3, 5 y 10, la ligación 21, con número de clonas 8 y 24 y la ligación 23, con número de clonas, 5, 9 y 15.

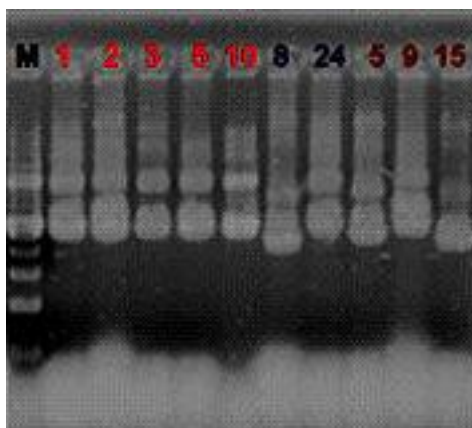


Figura 8. Gel de calidad del ADN plasmídico, M: Marcador de Peso Molecular, Carril 1,2, 3, 5, 10: Ligacion 13; Carril 8 y 24: Ligacion 21 y Carril 5, 9, 15: Ligación 23.

Después de la extracción del ADN plasmídico, se llevó a cabo la digestión con la enzima *EcoRI*. En la Figura 9 se observa que las clonas que liberaron el fragmento son 1, 2, 3, 5 y 10, de la ligación de la muestra 13 positiva. Además, las clonas 8 y 24 de la ligación de la muestra 21 y las clonas 5, 9 y 13 de la ligación de la muestra 23 también liberaron fragmento (Tabla 2).

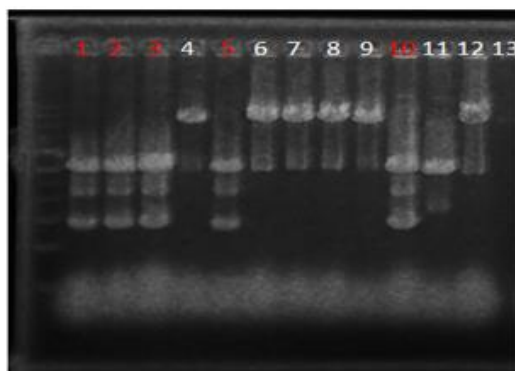


Figura 9. Gel de calidad digestión de *EcoRI* de la muestra 13 positiva.

Tabla 2. Clonas (+) para fitoplasma

No. de muestra	Clonas (+) para fitoplasma
13	1, 2, 3, 5, y 10
21	8 y 24
23	5, 9, y 15

Para el análisis de los RFLP's *in vivo*, se realizó el corte con las enzimas *EcoRI* y *HinfI* en las 10 clonas que liberaron el fragmento del PCR de fitoplasmas de las muestras 13, 21 y 23 de plantas de brocoli, esto con la finalidad de observar las diferencias de los patrones de bandeo. En la Figura 10, se observa que hay cuatro patrones de bandeo diferentes entre las clonas, la No. 1, 7, 5 y 15 de las tres diferentes muestras mencionadas anteriormente.

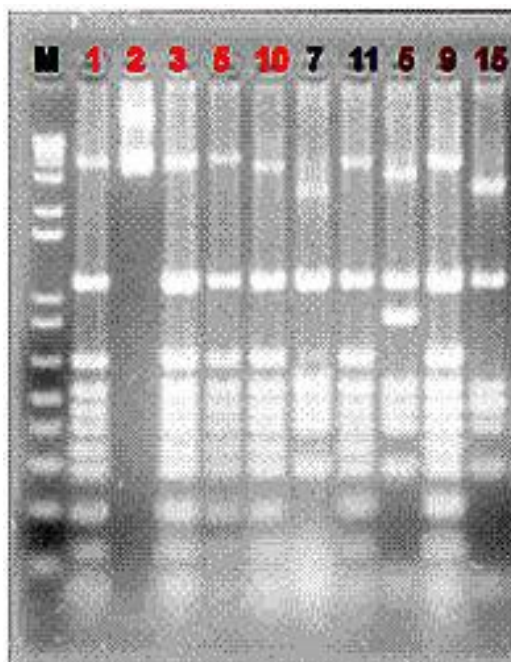


Figura 10. Gel de calidad de RFLP's

Estas muestras fueron mandadas a secuenciar al laboratorio del IPICYT (Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica), y una vez obtenido cada una de las secuencias, se realizó un alineamiento en línea (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) donde se observó un porcentaje del 99.9% de similitud entre ellas, asumiendo que se trata de un mismo fitoplasma.

De esta manera, se seleccionaron las clonas 1, 7, 5 y 15 para secuenciar y determinar si es una infección causada por un solo fitoplasma o es una infección mixta.

Análisis filogenético

Las secuencias BrocAgs1 fueron comparadas con las presentes en las bases de datos del programa computacional Iphyclassifier (Zhao *et al.*, 2013) y la máxima identidad a nivel de secuencia de todas las muestras, fue con la cepa de referencia para “*Ca. Phytoplasma trifolii*” (GenBank accession: AY390261) con un 99.0 de similitud. La clasificación de los fitoplasmas aislados durante el presente trabajo a nivel de grupo y subgrupo se realizó mediante el análisis de la secuencia BrocAgs1 por RFLP y geles virtuales obtenidos con el

mismo programa. El patrón de restricción virtual obtenido a partir de la secuencia BrocAgs1 mostro una alta similitud con el de los miembros del grupo 16Sr VI, subgrupo A (GenBank accession: AY390261), con un coeficiente de similitud de 1.0 (Figura 11).

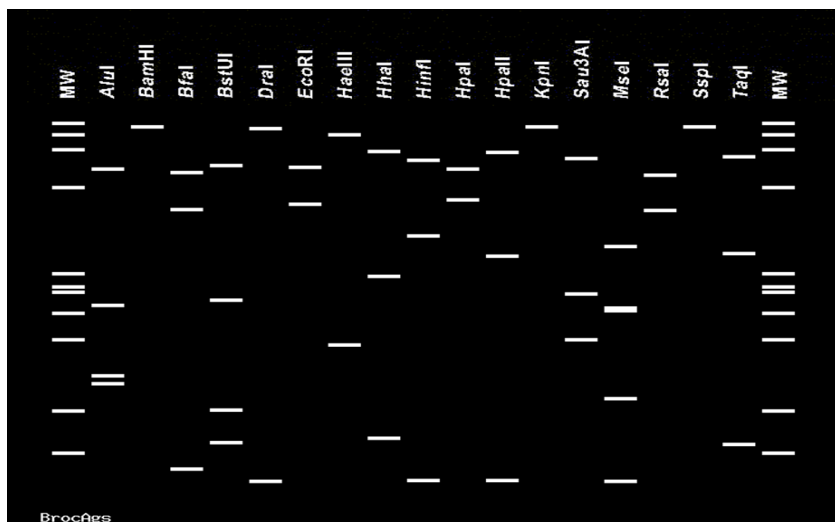


Figura 11. Patrones de restricción virtuales obtenidos a partir del análisis de las secuencias obtenidas con los iniciadores universales R16F2n / R16R2 mediante el programa computacional Iphiclassifier basado en la técnica de RFLPs. **(A)** Imágenes de los patrones de restricción de las secuencias xxx obtenidos a partir de la digestión por separado con cada una de las siguientes 17 enzimas: *AluI*, *BamHI*, *BfaI*, *BstUI*, *DraI*, *EcoRI*, *HaeIII*, *HhaI*, *HinfI*, *HpaI*, *HpaII*, *KpnI*, *Sau3AI*, *MseI*, *RsaI*, *SspI*, and *TaqI*. MW = Marcador de peso molecular obtenido de la digestión del ADN ϕ X174 digerido con la enzima *HaeIII*.

DISCUSIÓN

La ausencia de estudios de diagnóstico molecular de enfermedades y el aumento en la presencia de síntomas asociados con fitoplasmas en los diferentes cultivos incluido el cultivo de brócoli, ha hecho que los investigadores se enfoquen a estudiar el patosistema de los cultivos de interés económico.

Esta problemática se ha visto reiteradamente en una propagación de diversas enfermedades en los diferentes estados de la República Mexicana, dando alerta de dispersión de diferentes patógenos hacia los cultivos. De esta manera se proporciona a los productores, una alerta fitosanitaria, la cual ayudará a tener un mejor rendimiento en su cultivo observando la sintomatología producida por fitoplasma y no solo de brócoli, sino en cualquier cultivo de importancia agrícola.

En cuanto al cultivo de brócoli, la alerta es reciente, ya que actualmente no se encuentran muchos estudios realizado hacia la detección de fitoplasma en este cultivo; y como se ha mencionado, México se ha destacado en el cultivo de crucíferas, especialmente la coliflor y el brócoli, haciendo que el país sea uno de los exportadores más

importantes de brócoli. Por ello, el establecimiento de alertas fitosanitarias, es imperante, ya que se generan pérdidas económicas muy importantes en la economía del país.

[Collinge y Boller \(2001\)](#) mencionan que, un patógeno puede ser altamente virulento para un hospedante y levemente virulento para otro. Estos conceptos han sido discutidos por [Van Der Plank \(1968\)](#) quien propuso que el nivel de virulencia se determina con respecto a la resistencia del hospedante. Dicho así, la virulencia es la habilidad del patógeno de superar la resistencia de la planta.

Dado que los fitoplasmas son bacterias fitopatógenas asociadas con daños devastadores en más de 700 especies de plantas en todo el mundo ([Hogenhout y Bos, 2011](#)) . Es importante desde el punto de vista de la agricultura, identificar los factores que intervienen en su patogenicidad y descubrir medidas efectivas para controlar las enfermedades causadas por los fitoplasmas. A pesar de su importancia económica, los fitoplasmas siguen siendo los patógenos de plantas más pobremente caracterizados, principalmente porque los esfuerzos en el

cultivo *in vitro*, la administración de genes y la mutagénesis no han tenido éxito (Maejima *et al.*, 2014).

Trabajos realizados sobre fitoplasmas en brócoli, prácticamente son nulos. Los más cercanos han sido aquellos realizados en nabo (*Brassica rapa* L.) donde Azadavar y Baranwal (2010), recogieron muestras de este cultivo que exhibían filodia, virescencia, escoba de bruja, extensa malformación de partes florales, formación de vejigas y esterilidad floral, en cuatro lugares diferentes en India.

Aunque estos autores no indican el número total de muestras procesadas y con diagnóstico positivo, los resultados en éste trabajo fueron que de 23 plantas colectadas con sintomatología de fitoplasmosis, solo tres de ellas resultaron positivas. Este hecho se puede explicar porque la detección de los fitoplasmas es difícil debido a la distribución irregular y a la baja concentración presente en el tejido vegetal (Lee *et al.*, 1993; Namba *et al.*, 1993; Lorenz *et al.*, 1995), aunado al hecho de que además en este trabajo, se conformaron muestras mixtas de tejidos de hojas, tallo, raíz e inflorescencias de cada planta. Por lo anterior, es recomendable realizar un

estudio de la distribución espacial de este patógeno, abarcando los diferentes tejidos de plantas de brócoli por separado, y de esta manera, se podrían obtener diagnósticos más concordantes con la sintomatología observada.

Punto clave para el diagnóstico molecular, será el de enfocar el uso de material vegetal de las inflorescencias de brócoli, en búsqueda de ciertas proteínas específicas, ya que diversos autores (Hogenhout *et al.*, 2009; Dodds y Rathjen, 2010; Sugio *et al.*, 2011; Sugio *et al.*, 2014; Tomkins *et al.*, 2018) asumen que la filodia es causada por medio de efectores secretados por los mismos fitoplasmas, tal es el caso de la SAP11 y la SAP54 .

Por otro lado, el patrón de RFLP virtual generado por iPhyClassifier de secuencias de rDNA de 16S de 1,25 kb indicó que se trata de un solo fitoplasma, el cual pertenece al subgrupo 16Sr IX subgrupo C.

La sintomatología observada en brócoli en Aguascalientes, prácticamente es la misma que la encontrada en nabo de la India (Azadvar y Baranwal, 2010). Sin embargo, no es causada por el mismo

fitoplasma, ya que los resultados de este trabajo arrojaron al fitoplasma 16Sr VI subgrupo A. El patrón de restricción virtual mostró una alta similitud con los miembros del grupo 16SrVI, subgrupo A (AY390261), con un coeficiente de similitud de 0.98 y 0.97, respectivamente; identificando a si a '*Candidatus* Phytoplasma trifolii' como el fitoplasma encontrado en las muestras de brócoli. Este mismo fitoplasmas ya ha sido encontrado en el cultivo de chile mirasol en Zacatecas (Mauricio-Castillo *et al.*, 2015), así como en el cultivo de ajo (Reveles-Torres *et al.*, 2018) también en Zacatecas, y en insectos vectores como *Circulifer tenellus* (Helguera-Peña, 2016) *Ceratagallia nitidula* y *Empoasca abrupta* (Salas-Muñoz *et al.*, 2018).

Por otra parte, en lo referente a estudios sobre vectores de fitoplasmas capturados sobre plantas de brócoli, en Brasil (Eckstein *et al.*, 2014), se identificó la presencia de estos patógenos en cinco chicharritas: *Empoasca* spp., *Agallia albidula* Uhler, *Agalliana sticticollis* (Stål), *Planicephalus flavicosta* (Stål), y *Atanus nitidus* (Linnavuori), donde por análisis de secuenciación de ADN se identificó al fitoplasma 16Sr III. También el mismo autor y sus colaboradores confirmaron la

presencia de fitoplasma en el mismo cultivo, desde su infección en el floema (tallo), hasta en la inflorescencia del brócoli.

Estos resultados hablan de que los fitoplasmas en brócoli y en otras especies de Brassicas, pueden ser de una variabilidad genética muy importante, ya que al menos en tres estudios independientes en tres lugares diferentes, se han encontrado fitoplasmas distintos.

Asimismo, estos resultados parecen ser confirmados con estudios sobre detección y diferenciación de fitoplasmas por medio del gen *cpn60* de '*Candidatus Phytoplasma*' spp que codifica para Chaperonas (proteínas cuya función es la de ayudar al plegamiento de otras proteínas), específicas de fitoplasma, [Domonceaux y colaboradores \(2014\)](#) encontraron patrones diferentes de este gen *cpn60* de fitoplasmas infectando *Brassica napus* (nabo) y *Camelina sativa* (Sésamo); ambas especies pertenecientes a la familia de las Brassicace.

El estado de Aguascalientes es uno de los principales estados en la producción de brócoli para su consumo tanto nacional como internacional, y en todo el país forma una fuente importante de entrada económica

para la región, pues además de generar empleo, aporta nutrientes esenciales para la alimentación del ser humano, lo que lo hace la hortaliza con más popularidad para su consumo, para personas propensas al cáncer u otras enfermedades crónicas.

De ello que este estudio podría dar la iniciativa para la implementación de prevención en el manejo y cuidado del cultivo, teniendo en cuenta los posibles síntomas que provocan enfermedad en este cultivo. Así como también tener un conocimiento más amplio de los fitoplasmas y las enfermedades que estos causan. Al día de hoy, no hay muchos estudios en cuanto a la incidencia de fitoplasmas en la mayoría de los cultivos agrícolas. Trabajos como este, contribuyen al esfuerzo por abarcar el conocimiento de este fitopatógeno en aras sobre el manejo y prevención de la fitoplasmosis.

CONCLUSIONES

Por diagnóstico molecular se confirmó la presencia de fitoplasmas en plantas de brócoli (*Brassica oleracea*) con sintomatología de fitoplasmosis (enanismo, hojas cloróticas, filodia, tallo muy prominente y raíz con baja y

abundantes raíces secundarias) en parcelas agrícolas del estado de Aguascalientes.

Se precisó que el fitoplasma es "*Candidatus Phytoplasma trifolii*" perteneciente al grupo 16Sr VI, subgrupo A.

LITERATURA CITADA

Alma, A., Bosco, D., Danielli, A., Bertaccini, A., Vibio, M., Arzone, A., 1997. Identification of phytoplasmas in eggs, nymphs and adults of *Scaphoideus titanus* Ball reared on healthy plants. *Insect molecular biology* 6, 115-121.

Aredondo-Pérez, A., Reveles-Torres, L.R., Velásquez-Valle, R., 2013. Presencia de fitoplasmas asociados al síntoma de "yema grande" en chile para secado en Zacatecas, México. *Agrofaz* 13, 61-69.

Azadvar, M., Baranwal, V.K., 2010. Molecular Characterization and Phylogeny of a Phytoplasma Associated with Phyllody Disease of toria (*Brassica rapa* L. subsp. *dichotoma* (Roxb.)) in India. *Indian journal of virology : an official organ of Indian Virological Society* 21, 133-139.

Bosco, D., Tedeschi, R., 2013. Insect vector transmission assays, *Phytoplasma*. Springer, Place Book Section Published, pp. 73-85.

Collinge, M., Boller, T., 2001. Differential induction of two potato genes, *Stprx2* and *StNAC*, in response to infection by *Phytophthora infestans* and to wounding. *Plant Mol Biol* 46, 521-529.

- Dellaporta, S.L., Wood, J., Hicks, J.B., 1983. A plant DNA minipreparation: version II. *Plant molecular biology reporter* 1, 19-21.
- Dodds, P.N., Rathjen, J.P., 2010. Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics* 11, 539-548.
- Doi, Y., Teranaka, M., Yora, K., Asuyama, H., 1967. Mycoplasma-or PLT group-like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches' broom, aster yellows, or paulownia witches' broom. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn* 33, 259-266.
- Dumonceaux, T.J., Green, M., Hammond, C., Perez, E., Olivier, C., 2014. Molecular diagnostic tools for detection and differentiation of phytoplasmas based on chaperonin-60 reveal differences in host plant infection patterns. *PLoS One* 9, e116039.
- Eckstein, B., Barbosa, J., Kreyci, P., Zanol, K., Coelho, L., Gonçalves, A., Brunelli, K., Lopes, J., Bedendo, I., 2014. Identification of potential leafhoppers vectors of phytoplasmas (16SrIII group) associated with broccoli stunt disease in Brazil. *Australasian Plant Pathology* 43, 459-463.
- Fierro, C.J.A., 2009. Detección y caracterización molecular de fitoplasmas en híbridos comerciales de tomate y hospedantes alternos en Sinaloa, Departamento Agropecuario. Instituto Politécnico Nacional, Sinaloa, p. 86.
- Flores, L.A.V., Andrade, S.C., 2015. Estudio de Tecnologías de Energías Renovables. *Jóvenes en la Ciencia* 1, 1741-1745.
- Gundersen, D., Lee, I., 1996. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathologia mediterranea* 35, 144-151.

- Hanboonsong, Y., Choosai, C., Panyim, S., Damak, S., 2002. Transovarial transmission of sugarcane white leaf phytoplasma in the insect vector *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura). *Insect molecular biology* 11, 97-103.
- Helguera-Peña, J.E., 2016. Presencia de curtovirus e identidad de fitoplasmas en la chicharrita del betabel, (*Circulifer tenellus* Beker) durante el invierno., Unidad Académica de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Zacatecas, Zacatecas, Zac., México, p. 64.
- Hogenhout, S.A., Van der Hooft, R.A., Terauchi, R., Kamoun, S., 2009. Emerging concepts in effector biology of plant-associated organisms. *Molecular plant-microbe interactions* 22, 115-122.
- Hogenhout, S.A., Bos, J.I., 2011. Effector proteins that modulate plant-insect interactions. *Current opinion in plant biology* 14, 422-428.
- Hooker, W.J., 1981. Compendium of potato diseases. International Potato Center.
- Lee, I.-M., Hammond, R., Davis, R., Gundersen, D., 1993. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology* 83, 834-842.
- Lee, I., Gundersen, D., Davis, R., Bartoszyk, I., 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.
- Lorenz, K., Schneider, B., Ahrens, U., Seemüller, E., 1995. Detection of the apple proliferation and pear decline phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and nonribosomal DNA. *Phytopathology* 85, 771-776.

- Maejima, K., Oshima, K., Namba, S., 2014. Exploring the phytoplasmas, plant pathogenic bacteria. *Journal of General Plant Pathology* 80, 210-221.
- Mauricio-Castillo, J.A., Salas-Muñoz, S., Velásquez-Valle, R., Ambríz-Granados, S., Reveles-Torres, L.R., 2015. 'Candidatus Phytoplasma trifolii'(16SrVI) en chile mirasol (*Capsicum annuum* L.) cultivado en Zacatecas, México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 38, 389-396.
- Mauricio-Castillo, J.A., Reveles-Torres, L.R., Salas-Luévano, M.A., Franco-Bañuelos, A., Salas-Marina, M., Salas-Muñoz, S., 2018. First report of 'Candidatus Phytoplasma trifolii'-related strain associated with a new disease in tomatillo plants in Zacatecas, Mexico. *Plant Disease* 102, 1653.
- Musetti, R., Favali, M., Pressacco, L., 2000. Histopathology and polyphenol content in plants infected by phytoplasmas. *CYTOBIOS-CAMBRIDGE-*, 133-148.
- Namba, S., Oyaizu, H., Kato, S., Iwanami, S., Tsuchizak, T., 1993. Phylogenetic Diversity of Phytopathogenic Mycoplasmalike Organisms. *Systematic Bacteriology* 43, 461-467.
- Reveles-Torres, L., R., Velásquez-Valle, R., Mauricio-Castillo, J.A., 2014. Fitoplasmas: Otros agentes fitopatógenos, in: INIFAP (Ed.), *Campo Experimental Zacatecas*. CIRNOC-INIFAP, Calera de V.R., Zacatecas, México, p. 41.
- Reveles-Torres, L.R., Velásquez-Valle, R., Mauricio-Castillo, J.A., Salas-Muñoz, S., 2018. First report of 'Candidatus Phytoplasma trifolii'-related strain associated with a new disease on garlic in Zacatecas, Mexico. *Plant Disease* 102.
- Salas-Muñoz, S., Mauricio-Castillo, J.A., Dietrich, C., Creamer, R., Reveles-Torres, L.R., 2018. First report of the leafhoppers *Ceratagallia nitidula* Oman and *Empoasca abrupta* DeLong (Hemiptera: Cicadellidae) as vectors of 'Candidatus Phytoplasma trifolii'. *Plant Disease*.

- Smart, C.D., Schneider, B., Blomquist, C.L., Guerra, L.J., Harrison, N.A., Ahrens, U., Lorenz, K.H., Seemuller, E., Kirkpatrick, B., C., 1996. Phytoplasma-Specific PCR Primers Based on Sequences of the 16S-23S rRNA Spacer Region. *Applied and environmental microbiology* 62, 2988–2993.
- Sugio, A., MacLean, A.M., Grieve, V.M., Hogenhout, S.A., 2011. Phytoplasma protein effector SAP11 enhances insect vector reproduction by manipulating plant development and defense hormone biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, E1254-E1263.
- Sugio, A., MacLean, A.M., Hogenhout, S.A., 2014. The small phytoplasma virulence effector SAP11 contains distinct domains required for nuclear targeting and CIN-TCP binding and destabilization. *New Phytologist*.
- Swisher, K., Velásquez-Valle, R., Mena-Covarrubias, J., Munyaneza, J., 2016. Occurrence and molecular detection of *Spiroplasma citri* in carrots and its insect vector, *Circulifer tenellus*, in Mexico. *Journal of Plant Pathology* 98, 355-360.
- Tessitori, M., Masenga, V., Marzachi, C., 2006. First report of a phytoplasma associated with abnormal proliferation of cladodes in cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) in Italy. *Plant pathology* 55, 292-292.
- Tomkins, M., Klot, A., Marée, A.F., Hogenhout, S.A., 2018. A multi-layered mechanistic modelling approach to understand how effector genes extend beyond phytoplasma to modulate plant hosts, insect vectors and the environment. *Current opinion in plant biology* 44, 39-48.
- Tran-Nguyen, L.T., Schneider, B., 2013. Cesium chloride-bisbenzimidazole gradients for separation of phytoplasma and plant DNA. *Methods in molecular biology* 938, 381-393.
- Van Der Plank, J.E., 1968. *Disease Resistance in Plants*. Elsevier.

- Weintraub, P.G., Jones, P., 2010. *Phytoplasmas: Genomes, Plant Hosts and Vectors*. Wallingford, UK:, CABI
- Zamora, L., Acosta, K., Martínez, Y., 2012. First report of 'Candidatus *Phytoplasma asteris*' (16SrI group) affecting common bean in Cuba. *New Disease Reports* 25, 4.
- Zhao, Y., Wei, W., Lee, M., Shao, J., Suo, X., Davis, R.E., 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, 2582-2593.
- Zhao, Y., Wei, W., Lee, I.M., Shao, J., Suo, X., Davis, R.E., 2013. The iPhyClassifier, an interactive online tool for phytoplasma classification and taxonomic assignment. *Methods in molecular biology* 938, 329-338.

REVISIÓN TÉCNICA

Dr. Jaime Mena Covarrubias
INIFAP Zacatecas

M.C. Yasmín Ileana Chew Madinaveitia
INIFAP La Laguna

DISEÑO DE PORTADA

Dr. Luis Roberto Reveles Torres

CÓDIGO INIFAP

MX-0-241709-11-02-11-09-92

COMISIÓN EDITORIAL DEL CEZAC

Presidente: Dra. Raquel K. Cruz Bravo
Secretario: MC. Ricardo A. Sánchez Gutiérrez
Vocal: Dr. Luis R. Reveles Torres
Vocal: Dr. Francisco Gpe. Echavarría Cháirez
Vocal: MC. Mayra Denise Herrera

El proceso editorial de esta publicación y el formato electrónico se terminó en noviembre de 2018 en el Campo Experimental Zacatecas, Km 24.5 Carretera Zacatecas-Fresnillo. CP. 98500, Calera de V. R., Zacatecas, México.
Tel. 01 800 088 2222 ext 82328

Este documento se encuentra en formato digital, mediante página internet en descargas ilimitadas

CAMPO EXPERIMENTAL ZACATECAS

DIRECTORIO

MC. Ricardo Alonso Sánchez Gutiérrez
Director de Coordinación y Vinculación

Dr.	Guillermo Medina García	Agrometeorología y Modelaje
Dra.	Nadiezhdá Y. Ramírez Cabral	Agrometeorología y Modelaje
Ing.	José Israel Casas Flores	Agrometeorología y Modelaje
Dr.	Alfonso Serna Pérez	Fertilidad de suelos y nutrición vegetal
Ing.	José Ángel Cid Ríos	Frijol y Garbanzo
MC.	Juan José Figueroa González*	Frijol y Garbanzo
MC.	Mayra Denise Herrera	Frijol y Garbanzo
Dr.	Jorge A. Zegbe Domínguez	Frutales
MC	Valentín Melero Meraz	Frutales
Ing.	Manuel Reveles Hernández	Hortalizas
MC.	Miguel Servin Palestina*	Ingeniería de Riego
Dra.	Raquel Cruz Bravo	Inocuidad de Alimentos
MC	Enrique Medina Martínez	Maíz
MC.	Francisco A. Rubio Aguirre	Pastizales y Cultivos Forrajeros
Dr.	Ramón Gutiérrez Luna	Pastizales y Cultivos Forrajeros
Ing.	Ricardo A. Sánchez Gutiérrez	Pastizales y Cultivos Forrajeros
Dr.	Luis Roberto Reveles Torres	Recursos Genéticos: Forestales, Agrícolas, Pecuarios y Microbianos
Dr.	Jaime Mena Covarrubias	Sanidad Forestal y Agrícola
Dr.	Rodolfo Velásquez Valle	Sanidad Forestal y Agrícola
Dra.	Blanca I. Sánchez Toledano	Socioeconomía

* Becarios

WWW.INIFAP.GOB.MX

SAGARPA
SECRETARÍA DE AGRICULTURA,
GANADERÍA, DESARROLLO RURAL,
PESCA Y ALIMENTACIÓN



inifap

Instituto Nacional de Investigaciones
Forestales, Agrícolas y Pecuarias