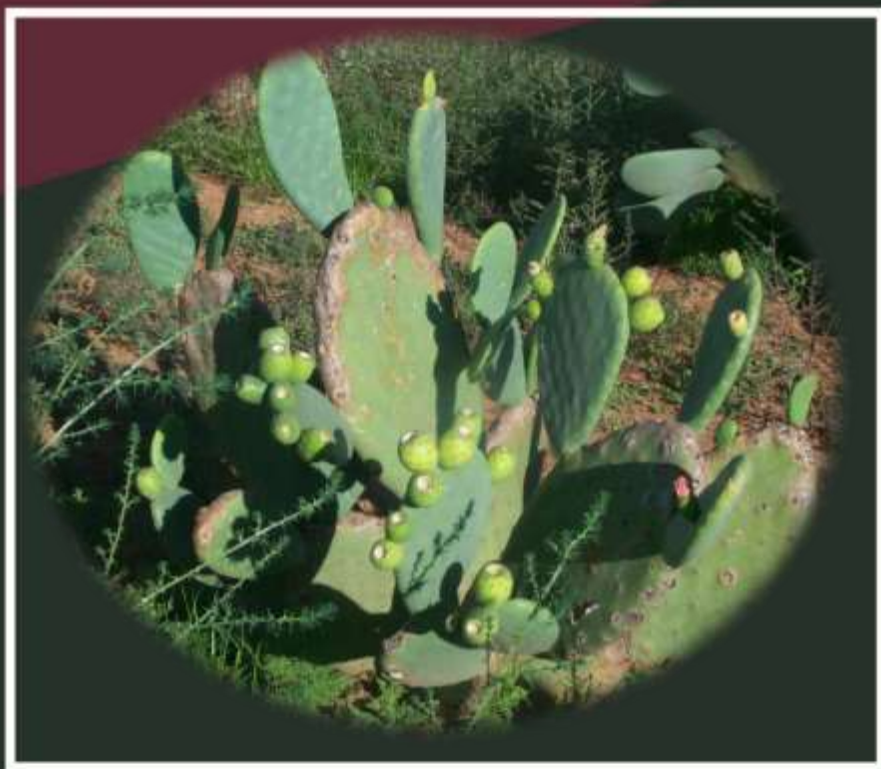


IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DEL AGENTE CAUSAL ASOCIADO A LA SINTOMATOLOGÍA DEL “ENGROSAMIENTO DEL CLADODIO” (*Opuntia* spp.) EN ZACATECAS

Dr. Luis Roberto Reveles Torres
Dra. Silva Salas Muñoz
Dr. Jorge Armando Mauricio Castillo
Dr. Miguel Ángel Salas Luevano



**Centro de Investigación Regional Norte Centro
Campo Experimental Zacatecas**

Calera de Víctor Rosales, Zacatecas
Folleto Técnico Núm. 115
Diciembre 2022

ISBN: 978-607-37-1497-6

Registro de Derechos de Autor: 03-2022-112909030100-01



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

inifap
INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN Y FOMENTO TECNOLÓGICO

SECRETARÍA DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL

DR. VÍCTOR MANUEL VILLALOBOS ARÁMBULA

Secretario

ING. VÍCTOR SUÁREZ CARRERA

Subsecretario de Autosuficiencia Alimentaria

M.V.Z. ARTURO MACOSAY CÓRDOVA

Coordinador General de Ganadería

DR. SALVADOR FERNÁNDEZ RIVERA

Coordinador General de Desarrollo Rural

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES

FORESTALES, AGRÍCOLAS Y PECUARIAS

DR. LUIS ÁNGEL RODRÍGUEZ DEL BOSQUE

Encargado del Despacho de los Asuntos Correspondientes
a la Dirección General del INIFAP

DR. ALFREDO ZAMARRIPA COLMENERO

Coordinador de Investigación, Innovación y Vinculación

DR. LUIS ORTEGA REYES

Coordinador de Planeación y Desarrollo

LIC. JOSÉ HUMBERTO CORONA MERCADO

Coordinador de Administración y Sistemas

CENTRO DE INVESTIGACIÓN REGIONAL NORTE-CENTRO

DR. JOSÉ ANTONIO CUETO WONG

Director Regional

DR. FRANCISCO JAVIER PASTOR LÓPEZ

Director de Investigación

ING. RICARDO CARRILLO MONSIVÁIS

Director de Administración

CAMPO EXPERIMENTAL ZACATECAS

DR. LUIS ROBERTO REVELES TORRES

Director de Coordinación y Vinculación

Identificación molecular del agente causal asociado a la sintomatología del “engrosamiento del cladodio” (Opuntia spp.) en Zacatecas

Dr. Luis Roberto Reveles Torres

Investigador del Programa de Recursos Genéticos
Campo Experimental Zacatecas

Dra. Silva Salas Muñoz

Investigadora del Programa Cátedras-CONACYT
Campo Experimental Zacatecas

Dr. Jorge Armando Mauricio Castillo

Docente-Investigador de la Unidad Académica de
Ciencias Químicas de la UAZ

Dr. Miguel Ángel Salas Luevano

Docente-Investigador de la Unidad Académica de
Agronomía de la UAZ

Instituto Nacional de Investigaciones Forestales,
Agrícolas y Pecuarias
Centro de Investigación Regional Norte Centro
Campo Experimental Zacatecas
Calera de Víctor Rosales., Zacatecas, México

Diciembre del 2022

Instituto Nacional de Investigaciones
Forestales, Agrícolas y Pecuarias
Progreso No. 5, Barrio de Santa Catarina
Alcaldía Coyoacán, C. P. 04010 Ciudad de México.
Teléfono (55) 3871-8700

Derechos Reservados ©

Folleto Técnico Núm. 115

***Identificación molecular del agente causal
asociado a la sintomatología del “engrosamiento
del cladodio” (Opuntia spp.) en Zacatecas***

ISBN: 978-607-37-1497-6

Registro de Derechos de Autor:
03-2022-112909030100-01

Primera Edición Diciembre del 2022

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, por registro u otros métodos, sin el permiso previo y por escrito de la institución.

Hecho en México

Contenido

1.	Introducción.....	1
2.	Colecta de muestras de plantas de nopal y análisis molecular	7
3.	Resultados.....	12
3.1	Detección molecular de fitoplasmas.....	12
3.2	Digestión de fragmentos.....	13
3.3	RFLPs en fresco de las clonas	15
3.4	Análisis de las secuencias obtenidas.....	16
4.	Discusión	18
5.	Conclusiones.....	23
6.	Literatura Citada	24

Índice de Figuras

- Figura 1. Síntomas característicos de la enfermedad de engrosamiento de cladodio en una huerta comercial de nopal, con apreciación de cladodios y frutos sanos.....**2**
- Figura 2. Capas principales del cladodio del nopal**6**
- Figura 3. Aborto de flor, necrosis foliar, pérdida de espinas, amarillamiento, deformación y proliferación de cladodios presentes en nopal.....**8**
- Figura 4. Detección de fitoplasmas mediante la PCR anidada en plantas de nopal. Carril M: Marcador de peso molecular 1 kb; Carriles 1-5: Muestras de plantas de nopal sintomáticas; Carril 6: Control positivo; Carril 7: Control negativo.....**13**
- Figura 5. Digestión con la enzima EcoRI de 15 de las 30 clonas de las ligaciones N2, N3 y N4, de las muestras de las plantas de nopal Marcador de peso molecular 1kb (Carril M) y patrón de restricción observado en todas las clonas positivas (dos bandas por el corte de restricción de la enzima) para la presencia del producto de PCR de 1,250 pb (Carriles 1-15), Clona sin digerir (Carril 16).....**14**
- Figura 6. Fragmentos de restricción de longitud polimórfica con las enzimas de restricción EcoRI y HinfI. Marcador de peso molecular 1 kb (M) y patrón de restricción obtenido a partir de la digestión doble de las clonas obtenidas a partir de las ligaciones N2, N3 y N4 (Carriles 1-4).....**15**
- Figura 7. Árbol filogenético de las secuencias del gen 16S RNAr de fitoplasmas obtenidas en la base de datos del genbank del NCBI, usando la herramienta del Blastn.....**16**
- Figura 8. Análisis de restricción con el programa lphyclassifier de la secuencia aislada Patrones de restricción virtuales obtenidos a partir del análisis de las secuencias obtenidas con los oligonucleótidos universales r16f2n/r16r2, mediante el programa computacional lphiclassifier basado en la técnica de los fragmentos de restricción de longitud polimórfica. Imágenes de los patrones de restricción de las secuencias de las muestras a3 y b7, obtenidos de la digestión por separado con cada una de las siguientes 17 enzimas: AluI, BamHI, BfaI, Bstul, DraI, EcoRI, HaeIII, HhaI, HinfI, HpaI, HpaII, KpnI, Sau3AI, MseI, RsaI, SspI y TaqI.....**19**

1. Introducción

En México, el nopal ha sido utilizado desde tiempos ancestrales y su empleo no se limitaba solo al consumo alimenticio ya que su uso como planta ornamental y con fines medicinales ha sido muy común. Posiblemente nativos que emigraban en la época de maduración de tuna a las zonas nopaleras, propiciaron la formación de algunos pueblos (Torres-Ponce *et al.*, 2015).

El cultivo de nopal es de gran importancia económica, social y cultural en todas las regiones productoras de este frutal incluyendo al estado de Zacatecas. En este Estado se ha reportado una enfermedad conocida como "engrosamiento del cladodio" en el cultivo de nopal tunero (*Opuntia* spp) atribuida a la presencia de fitoplasmas (Hernández *et al.*, 2009). En los últimos años, esta enfermedad se ha considerado como el principal factor limitante de la producción de tunas en el país, ya que las plantas afectadas presentan deformación, proliferación de brotes, engrosamiento y desarrollo de cordiforme del cladodio, y detención del

crecimiento y menor productividad. En diversos recorridos de campo, se identificaron parcelas de nopal en el municipio de Pinos, Zacatecas, donde se observaron plantas de nopal tunero con síntomas como: engrosamiento, aborto de flor, necrosis foliar, pérdida de espinas, mosaico y amarillamiento, manchas anulares en cladodios, además de proliferación y deformación de frutos (Figura 1), que pudieran estar asociados a la presencia de fitoplasmas.

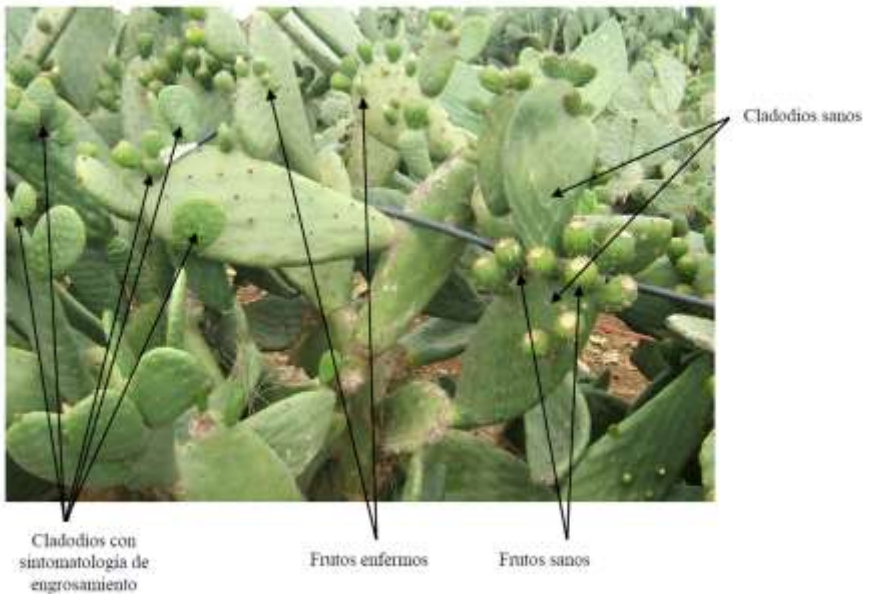


Figura 1. Síntomas característicos de la enfermedad de engrosamiento de cladodio en una huerta comercial de nopal, con apreciación de cladodios y frutos sanos.

Las enfermedades asociadas a la infección por fitoplasmas están ampliamente dispersas por el mundo y son propagadas por insectos que se alimentan del floema de las plantas.

En la literatura se han reportado más de 100 especies de hospederos de fitoplasmas y muchas de ellos son cultivos con un alto interés para la agricultura (Reveles-Torres *et al.*, 2014). Los fitoplasmas adquieren importancia como agentes patogénicos debido a la amplia gama de enfermedades que causan en diversos cultivos y a las pérdidas económicas que originan, ya que en algunos casos alcanzan entre 54 y 100 %.

En el cultivo de nopal se han identificado varias plagas y enfermedades, para las cuales con base en estudios en sanidad vegetal se han desarrollado diversos métodos de control. Sin embargo, para el engrosamiento se tienen muy pocos avances y alternativas para su manejo, ya que incluso aún se está en la etapa del correcto diagnóstico de la enfermedad.

Por ésta razón se establece la necesidad de implementar técnicas de detección molecular que permitan identificar al o los posibles agentes causales, e incluso la obtención y análisis de la secuencia de ácido desoxirribonucleico (ADN) y a partir de esto, diseñar estrategias que ayuden a controlar la diseminación de la enfermedad a distintas áreas geográficas donde se cultiva esta especie vegetal.

Actualmente, técnicas serológicas y moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), e inmunología son herramientas usadas en la detección de patógenos como los fitoplasmas, aún en bajas concentraciones, mejorando la seguridad y especificidad del diagnóstico. En lo que se refiere a los fitoplasmas, la PCR es la técnica más efectiva para su detección tanto en la planta hospedera como en su vector, y se amplifican secuencias específicas del gen 16S rRNA de este grupo de microorganismos (Lee *et al.*, 2000).

Normalmente, los fitoplasmas se encuentran restringidos al floema de su huésped, en

concentraciones muy bajas y distribuidos de manera irregular, por lo tanto, no son fáciles de detectar. Una alternativa ha sido el uso de la PCR anidada, que involucra la combinación de dos diferentes juegos de oligonucleótidos universales (Waterwork y Mock, 1999).

Anatómicamente el cladodio (que es la penca) está constituido por tres regiones, cutícula, clorénquima e hidrénquima, éstas se pueden observar al realizar cortes transversales (Figura 2). En la región del clorénquima se encuentra el floema, tejido vascular en el que se alojan los fitoplasmas.

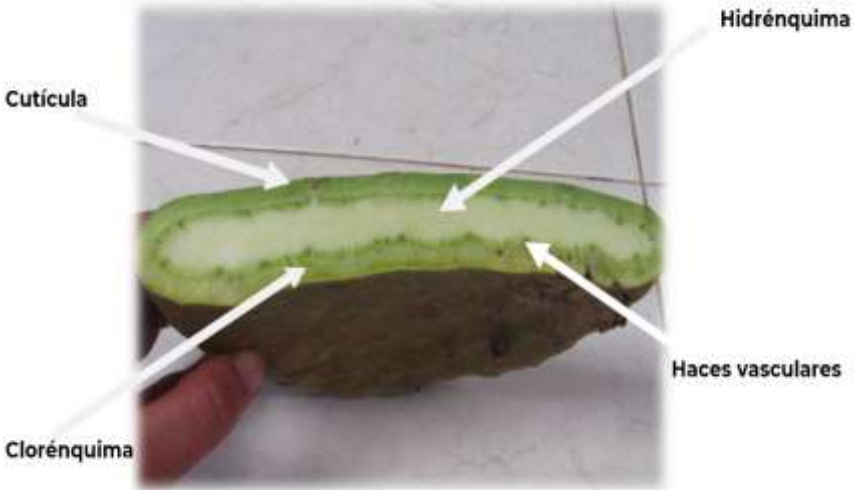


Figura 2. Capas principales del cladodio del nopal

Por décadas, ha sido insuficiente la información disponible para la identificación del patógeno asociado al engrosamiento del cladodio en el nopal tunero, y por ende su posible control. Sin embargo, el uso de las técnicas moleculares sin duda puede ayudar a mejorar el diagnóstico de esta enfermedad en las regiones nopaleras. De esta manera, el objetivo de este estudio fue detectar e identificar molecularmente al patógeno asociado a la sintomatología del “engrosamiento del cladodio” en el nopal tunero.

2. *Colecta de muestras de plantas de nopal y análisis molecular*

La colecta de las plantas de nopal se realizó en el municipio de Pinos, Zacatecas (22°18'0" N, 101°34'0" W) en el mes de julio del 2021, las cuales presentaban visiblemente síntomas asociados a la infección por fitoplasmas (Figura 3). Se tomaron 22 muestras en cuatro parcelas comerciales y seis muestras en poblaciones silvestres dentro del mismo municipio. Cada muestra consistió en hacer un corte del cladodio de 5 cm x 5 cm, el cual fue envuelto en papel estraza y guardado en una hielera con bolsas de gel congelado.

A las parcelas comerciales, se les calculó con un 30% de severidad por la presencia de “engrosamiento del cladodio”. Igualmente se tomaron muestras de seis plantas asintomáticas como control. Las muestras de nopal muestreadas se trasladaron al laboratorio de Diagnóstico Molecular en Sanidad Vegetal del Campo Experimental Zacatecas.



Figura 3. Aborto de flor, necrosis foliar, pérdida de espinas, amarillamiento, deformación y proliferación de cladodios presentes en nopal.

La extracción de ADN se realizó con el protocolo de Dellaporta *et al.*, (1983) a partir del tejido de los haces vasculares de las muestras de plantas de nopal con sintomatología asociada a fitoplasmas y de las muestras de plantas aparentemente sanas que fueron utilizadas como testigo en el diagnóstico.

Después de la extracción de ADN total, se realizó la técnica de PCR anidado, la cual consta de dos protocolos de amplificación. El primero (PCR directa) con los oligonucleótidos universales P1 5'-

AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT-3' (sentido) y Tint 5'-TCAGGCGTGTGCTCTAACCAGC-3' (antisentido), los cuales amplifican un fragmento de 1,700 pares de bases (pb) aproximadamente. Las condiciones para este primer protocolo de amplificación fueron las siguientes: Desnaturalización del ADN a 95 °C por 2 min, y 30 ciclos de: desnaturalización a 94 °C por 1 minuto, hibridación de los cebadores a 56°C por 1 min, y extensión a 72 °C por 2 minutos; extensión final a 72°C por 5 min (Smart *et al.*, 1996).

El segundo protocolo de amplificación (PCR anidado) se llevó a cabo con los oligonucleótidos R16F2n 5'-GAAACGACTGCTAAGACTGG-3' (sentido) y R16R2 5'-TGACGGGCGGTGTGTACAAACCCCG-3' (antisentido), los cuales amplifican un fragmento de 1,250 pb (Gundersen y Lee, 1996). Las condiciones para el segundo protocolo de amplificación fueron las siguientes: Desnaturalización del ADN a 94 °C por 2 minutos, y 30 ciclos de: desnaturalización a 94 °C por 1 minuto, hibridación de los cebadores a 55 °C por 2 minutos, y extensión a 72 °C por 2 minutos; extensión final a 72 °C por 5 minutos.

El ADN genómico, ADN plasmídico, los productos de PCR y los productos digeridos, se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.2%. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio a una concentración de 0.5 µg/ml. Los geles se visualizaron en una cámara de luz ultravioleta.

Los amplicones obtenidos a partir de las muestras positivas fueron clonados en el vector pGEM- Teasy (Promega) según las recomendaciones de la casa comercial (Invitrogen®), y se transformaron por método de choque térmico en células *E. coli* competentes. Después, de la transformación de cada una de las ligaciones (N2, N3 y N4), se extrajo el ADN plasmídico de las colonias blancas mediante la técnica de minipreps.

Consecutivamente, se llevó a cabo la digestión con la enzima *EcoRI*, con el fin de liberar el fragmento clonado ya que presenta dos sitios de corte en el vector de clonación pGEM-T Easy, y se encuentran flanqueado el sitio donde se inserta el producto de PCR.

Para la secuenciación de las muestras positivas de nopal, se seleccionaron 2 clonas de cada una de las ligaciones obtenidas (N2, N3 Y N4), y se enviaron a secuenciar al Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (LANBAMA) en San Luis Potosí. Las secuencias de ADN obtenidas fueron editadas y ensambladas, con el programa computacional DNASTAR Lasergene EditSeq versión 7.1.0.

Se realizó el análisis de los fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLPs) simulado del gen 16S rRNA (ácido ribonucleico ribosomal) de las secuencias obtenidas. Las secuencias alineadas 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). Estas enzimas utilizadas fueron *AluI*,

*Bam*HI, *Bfal*, *Bst*UI (*Tha*I), *Dra*I, *Eco*RI, *Hae*III, *Hha*I, *Hin*fI, *Hpa*I, *Hpa*II, *Kpn*I, *Sau*3AI (*Mbo*I), *Mse*I, *Rsa*I, *Ssp*I, y *Taq*I. Después de la digestión de restricción *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.

3. Resultados

3.1 Detección molecular de fitoplasmas

La amplificación del ADN ribosomal de fitoplasmas en plantas de nopal mediante PCR anidada, generó un fragmento de 1,250 pb correspondiente al gen que codifica para el ARN ribosomal 16S. Los resultados obtenidos indicaron que 3 de las 5 muestras de nopal sintomáticas resultaron positivas para la presencia de fitoplasmas (Figura 4).

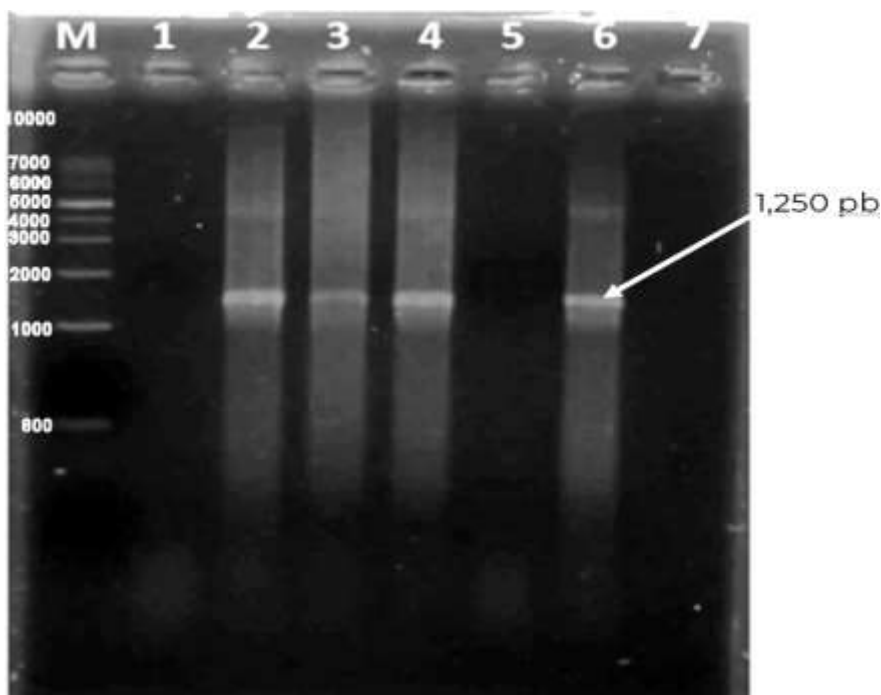


Figura 4. Detección de fitoplasmas mediante la PCR anidada en plantas de nopal. Carril M: Marcador de peso molecular 1 kb; Carriles 1-5: Muestras de plantas de nopal sintomáticas; Carril 6: Control positivo; Carril 7: Control negativo.

3.2 Digestión de fragmentos

En la Figura 5 se observa un gel de agarosa que muestra los fragmentos de restricción obtenidos a partir de la digestión de las clonas obtenidas con la enzima *EcoRI*. Esta digestión liberó tres fragmentos, uno de 3,000 pb, el cual corresponde al tamaño del vector y dos entre 500 y 1,000 pb, los cuales al sumar las

dos bandas suman un fragmento a los 1,250 pb del gen 16S de fitoplasma. Cabe resaltar que se obtuvieron cuatro clonas positivas de cada una de las ligaciones realizadas, las cuales aparentemente contenían el fragmento de PCR del tamaño esperado (1,250 pb). Las clonas que se obtuvieron de las ligaciones la N2, N3 y N4 mostraron el mismo patrón de digestión con la enzima *EcoRI* y las clonas con mejor calidad se seleccionaron para ser sometidas a una doble digestión con las enzimas *EcoRI* y *Hinfl* (RFLPs), se muestran en la Figura 5.

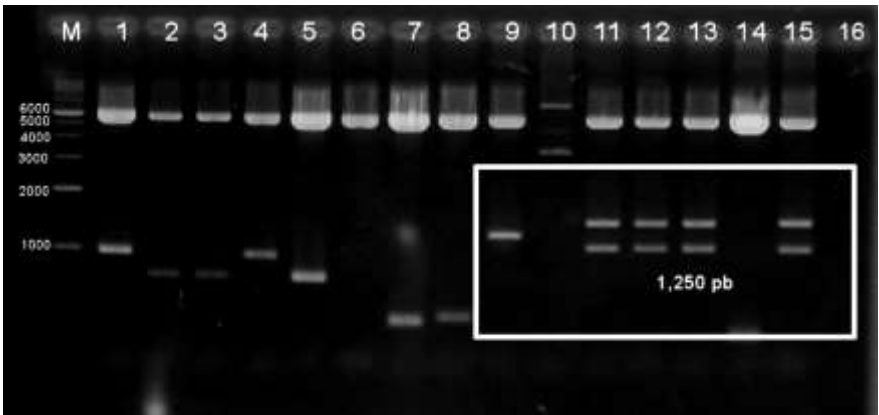


Figura 5. Digestión con la enzima *EcoRI* de 15 de las 30 clonas de las ligaciones N2, N3 y N4, de las muestras de las plantas de nopal. Marcador de peso molecular 1kb (Carril M) y patrón de restricción observado en todas las clonas positivas (dos bandas por el corte de restricción de la enzima) para la presencia del producto de PCR de 1,250 pb (Carriles 1-15), Clona sin digerir (Carril 16).

3.3 RFLPs en fresco de las clonas

En la Figura 6, se confirma que el patrón de restricción obtenido no muestra la presencia de bandas polimórficas, todas las clonas positivas analizadas presentan el mismo perfil, confirmando que la infección y sintomatología observada en las plantas de nopal analizadas en el presente trabajo es del tipo sencilla (causada por un solo tipo de fitoplasma).

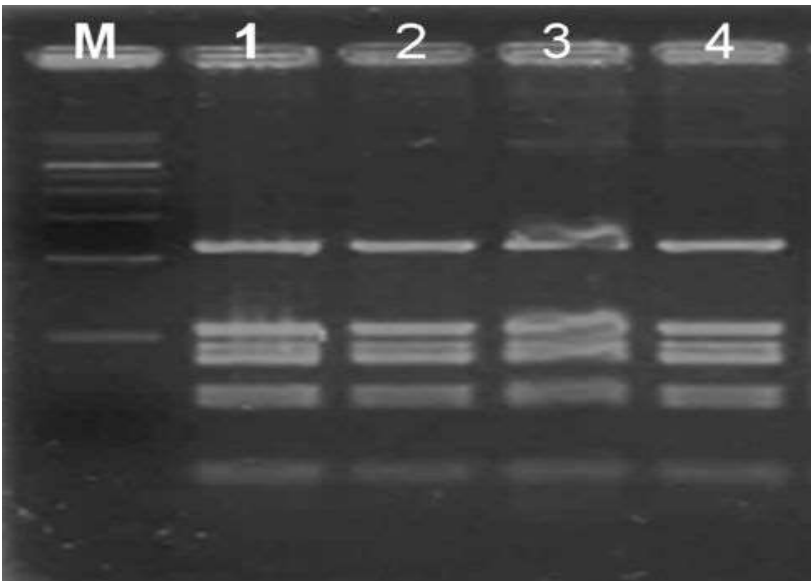


Figura 6. Fragmentos de restricción de longitud polimórfica con las enzimas de restricción *EcoRI* y *HinfI*. Marcador de peso molecular 1 kb (M) y patrón de restricción obtenido a partir de la digestión doble de las clonas obtenidas a partir de las ligaciones N2, N3 y N4 (Carriles 1-4).

3.4 Análisis de las secuencias obtenidas

Las secuencias obtenidas a partir de los fragmentos de ADN amplificadas en las PCR presentaron entre ellas un porcentaje de identidad del 100%. Las secuencias se compararon con las depositadas en el GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI), mediante el programa Blastn, dando como resultado que todas las secuencias completas obtenidas y analizadas corresponden al gen que codifica para el RNA ribosomal 16S del fitoplasma que pertenece al grupo VI subgrupo A (Figura 7).

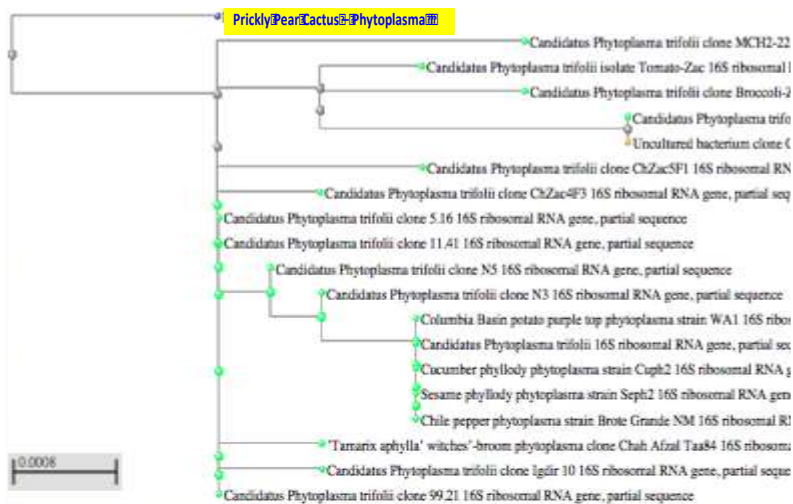


Figura 7. Árbol filogenético de las secuencias del gen 16S rRNA de fitoplasmas obtenidas en la base de datos del genbank del NCBI, usando la herramienta del Blastn.

El análisis de una secuencia de ADN representativa aislada de nopal utilizando la base de datos de iPhyClassifier (Zhao., 2013). Dio como resultado que la máxima identidad a nivel de secuencia fue obtenida con la cepa de referencia para '*Candidatus Phytoplasma trifolii*' con un 99.0% de similitud, (GenBank accession: AY390261). El patrón de restricción virtual de las secuencias de fitoplasmas, mostraron una alta similitud con los miembros del grupo 16SrVI con un coeficiente de similitud de 1.00 (GenBank accession: AY390261). Para el caso de la identificación a nivel de subgrupo, se obtuvo un resultado aún más claro ya que el algoritmo utilizado indicó que la secuencia de ADN del fitoplasma aislado durante el presente estudio representa el primer aislado a nivel mundial de un nuevo subgrupo denominado 16SrVI-K.

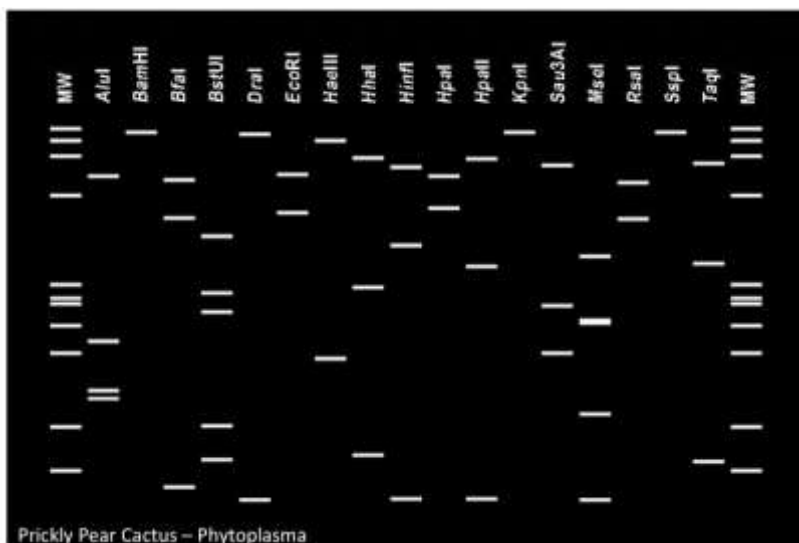


Figura 8. Análisis de restricción con el programa Iphyclassifier de la secuencia aislada. Patrones de restricción virtuales obtenidos a partir del análisis de las secuencias obtenidas con los oligonucleótidos universales r16f2n/r16r2, mediante el programa computacional Iphicclassifier basado en la técnica de los fragmentos de restricción de longitud polimorfa. Imágenes de los patrones de restricción de las secuencias de las muestras a3 y b7, obtenidos 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* y *TaqI*.

4. Discusión

Los síntomas de engrosamiento y proliferación del cladodio, así como la deformación de frutos en el nopal han sido asociados a la presencia de fitoplasmas (Bertaccini *et al.*, 2007; Hernández *et al.*, 2009). Durante

el presente trabajo se colectaron y analizaron muestras de plantas de nopal (*Opuntia* spp. L.) localizadas en varias huertas comerciales del municipio de Pinos, Zacatecas que presentaban una sintomatología asociada con la presencia de fitoplasmas (aborto de flor, necrosis foliar, pérdida de espinas, amarillamiento, deformación y proliferación de cladodios). Tres de las cinco muestras sintomáticas analizadas fueron positivas para la presencia de fitoplasmas; mientras que las muestras provenientes de las plantas asintomáticas fueron negativas. Esto confirma que no se detectaron infecciones asintomáticas que pudieran dar información sobre una posible resistencia natural de la planta ante el fitopatógeno; aun así, es necesario implementar variantes de la PCR punto final o utilizar PCR de tiempo real, dos técnicas que son más sensibles para la detección y evitar especular sobre la posibilidad de contar con un falso negativo que lleve a conclusiones erróneas sobre la resistencia natural, ya que en éste trabajo solo se muestrearón plantas de una sola variedad.

Un aspecto a destacar es que aún y cuando todas las muestras sintomáticas presentaron la misma sintomatología sólo tres fueron positivas para la identificación de fitoplasmas por PCR anidada y esto se debe a varios factores entre los que destacan es que la concentración de ADN de fitoplasmas es muy baja dificultando su amplificación, muchas veces no necesariamente se localizan en el tejido que muestra los síntomas si no que el proceso de infección dentro de la planta se realiza gracias a la acción de moléculas conocidas como efectores. El ADN de fitoplasmas contiene hasta un 60% de timinas y adeninas haciendo que la molécula se torne más sensible y fácil de degradar ante factores físicos como el calor y/o sustancias químicas como la utilizadas al momento de la extracción de ADN (Dickinson *et al.*, 2012).

La técnica de RFLPs indicó que el fitoplasma asociado a la sintomatología anteriormente descrita en las plantas de nopal analizadas pertenece a un solo grupo de este tipo de patógenos ya que los patrones de restricción fueron idénticos. lo que hizo suponer que se

trata del mismo fitoplasma. Se decidió utilizar la técnica de RFLPs basándose en lo reportado por algunos autores (Salas-Muñoz *et al.*, 2016) de esta manera, se enviaron a secuenciar un número reducido de clonas, las cuales presentaban mejor calidad.

Lo expuesto anteriormente resalta la necesidad de tener claro que aunque la técnica de la PCR anidada tiene un alto grado de confiabilidad no está exenta de ofrecer resultados falsos positivos o falsos negativos es por eso que se requiere que el diagnóstico molecular de enfermedades de plantas se realice a nivel de obtención y análisis de las secuencias de ADN del patógeno tal y como lo han hecho los últimos reportes sobre la presencia de fitoplasmas en México (Mauricio-Castillo., 2015; Salas-Muñoz., 2016; Reveles-Torres., 2018).

Existen reportes de fitoplasmas de los grupos 16SrI (Leopold *et al.*, 2011), 16SrII (Hernández-Pérez *et al.*, 2009) y 16SrXIII (Suaste-Dzul *et al.*, 2012) asociados a afectaciones en nopal en México. Sin embargo, no existen reportes sobre fitoplasmas pertenecientes al grupo 16SrVI (*Candidatus* phytoplasma trifolii) que

infecten especies de Cactáceas. '*Candidatus phytoplasma trifolii*' se ha relacionado con la presencia de nuevas enfermedades en varios cultivos importantes en México (Reveles-Torres *et al.*, 2018) y, se ha observado su proliferación en los campos de nopal alcanzando una incidencia de hasta el 8%; tal incremento puede estar relacionado con la práctica habitual de no utilizar insecticidas en éste cultivo, aumentando la presencia de insectos que pueden actuar como posibles vectores de fitoplasmas.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, representan el primer reporte a nivel mundial sobre la presencia en el cultivo de nopal de un miembro del nuevo subgrupo de fitoplasmas denominado K y, que perteneciente al grupo VI de '*Candidatus Phytoplasma trifolii*'. Finalmente, la capacidad de *Candidatus Phytoplasma trifolii* para infectar nuevos hospederos cómo otras cactáceas y su diseminación a nuevas áreas geográficas, ya sea por traslado antropogénico de material vegetativo o por los nuevos movimientos de colonización de insectos vectores a causa del cambio climático, lo posicionan como el fitoplasma más

ampliamente distribuido en la región centro-norte de México.

5. Conclusiones

A nivel de secuencia de ADN se identificó la presencia de '*Candidatus Phytoplasma trifolii*', como el agente causal asociado a la sintomatología de engrosamiento del cladodio en plantas de nopal (*Opuntia* spp. L), en huertas comerciales del municipio de Pinos, Zacatecas.

Mediante el análisis de la secuencia del ADN amplificado en el presente trabajo, se establece que este es el primer reporte a nivel mundial de un nuevo subgrupo de fitoplasmas denominado 16SrVI-K que afecta al nopal.

6. *Literatura Citada*

- Bertaccini A, Calari A, and Felker P. 2007. Developing a method for phytoplasma identification in cactus pear samples from California. *Bulletin of Insectology* 60:257-258.
- Dellaporta, S.L., Wood, J., and Hicks, J.B., 1983. A plant DNA minipreparation: version II. *Plant Molecular Biology Reporter* 1, 19-21.
- Dickinson M., Tuffen M. and Hodgetts J.. 2012. The phytoplasmas: An introduction. In: *Phytoplasma: Methods and Protocols*. M. Dickinson and J. Hodgetts (eds.). Humana Press. Pp: 1-14.
- Gundersen, D. E. and Lee, I. M. 1996. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathol. Medit.* 35: 144-151.
- Hernández P.R, Noa C.J.C, Gaspar R, Mata P. and Flores E.N. 2009. Detection of phytoplasma on indian fig (*Opuntia ficus-indica* Mill) in Mexico central region. *On Line Journal of Biological Sciences* 9:62-66.
- Hernández-Pérez, R., Noa-Carrazana, J. C., Gaspar, R., Mata, P., and Flores-Estévez, N. 2009. First report of symptoms associated to a phytoplasma affecting

nopal (*Opuntia ficus-indica* Mill) in the “Pyramids” Indian, State of Mexico. Journal of General and Molecular Virology, 1(4), 046-047.

Lee, M., Gundersen, D., Davis, R., and Bartoszy, 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.

Lee I.M, Davis R.E, and Gundersen D.E. 2000. Phytoplasma: phytopathogenic mollicutes. Annual Review of Microbiology 54, 221–55.

Leopold, F. Z., Maria, D. J. Y. E. M., Lobana, A. M., and Enrique, G. P. 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(8), 910-918.

Mauricio-Castillo, J.A., Salas-Muñoz S., Velásquez-Valle R., Ambríz-Granados S. y Reveles-Torres L.R. 2015. ‘*Candidatus* Phytoplasma Trifolii’(16srvi) En Chile Mirasol (*Capsicum Annuum* L.) Cultivado En Zacatecas, México. Revista Fitotecnia Mexicana 38, no. 4 (2015): 389-96.

- Reveles-Torres, L.R., Velásquez-Valle, R., y Mauricio-Castillo, J. A. 2014. Fitoplasmas: Otros agentes fitopatógenos. In INIFAP (Ed.), Campo Experimental Zacatecas (Vol. 56, pp. 41). Calera de V.R., Zacatecas, México: CIRNOC-INIFAP.
- Reveles-Torres L.R., Velásquez-Valle R., Mauricio-Castillo J.A. and Salas-Muñoz S. 20018. First Report of 'Candidatus Phytoplasma Trifolii'-Related Strain Associated with a New Disease on Garlic in Zacatecas, Mexico. *Plant Disease* 102, no. 12: 2636.
- Salas-Muñoz, S., Velásquez-Valle R., Reveles-Torres L.R., Creamer R. and Mauricio-Castillo J.A. 2016. First Report of 'Candidatus Phytoplasma Trifolii'-Related Strain Associated with a New Disease in Tomato Plants in Zacatecas, Mexico. *Plant Disease* 100, no. 11: 2320.
- Smart, C. D., Schneider, B., Blomquist, C. L., Guerra, L. J., Harrison, N. A., Ahrens, U. and 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.

- Suaste-Dzul, A., Rojas Martínez, R. I., Zavaleta Mejía, E., y 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), 81-85.
- Torres-Ponce, R. L., Morales-Corral, D., Ballinas-Casarrubias, M. D. L., y Nevárez-Moorillón, G. V. 2015. El nopal: planta del semidesierto con aplicaciones en farmacia, alimentos y nutrición animal. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 6(5), 1129-1142.
- Waterwork, H. E. and Mock, R. 1999. An assessment of nested PCR to detect phytoplasmas in imported dormant buds and internodal tissues of quarantined tree fruit germplasm. *Plant Dis.* 83(11):1047-1050.
- Zhao, Y., Wei, W., Lee, M., Shao, J., Suo, X., and 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., and Davis, R.E., 2013. The iPhyClassifier, an interactive online tool

for phytoplasma classification and taxonomic assignment. *Methods in molecular biology* 938, 329-338.

La cita correcta de este folleto es:

Reveles-Torres L.R.; Salas-Muñoz S.; Mauricio-Castillo J.A.; y Salas-Luevano M.A. 2022. Identificación molecular del agente causal asociado a la sintomatología del “engrosamiento del cladodio” (*Opuntia* spp.) en Zacatecas. Folleto Técnico Núm. 115. Campo Experimental Zacatecas, CIRNOC-INIFAP. 29 pp.

Comité Editorial del CIRNOC

M.C. Yasmin Ileana Chew Madinaveitia
Dr. Esteban Salvador Osuna Ceja
Dr. José Ángel Sígala Rodríguez
Dr. Pedro Jurado Guerra
Dra. Blanca Isabel Sánchez Toledano
M.C. María Gabriela Ramírez Valadez
Dr. Arturo Corrales Suastegui

Comité Editorial del CE Zacatecas

Presidente: Dra. Blanca Isabel Sánchez Toledano
Secretario: Dr. Luis Roberto Reveles Torres
Vocal: MC. Mayra Denise Herrera
Vocal: Dr. Francisco Guadalupe Echavarría Cháirez
Vocal: MC. Ricardo Alonso Sánchez Gutiérrez

Edición

Dr. Luis Roberto Reveles Torres
Dra. Silvia Salas Muñoz

Diseño y fotografía

Dr. Luis Roberto Reveles Torres

Código INIFAP

MX-0-310801-51-02-11-09-115

El proceso editorial de esta publicación y el formato electrónico se terminó en diciembre de 2022, en el Campo Experimental Zacatecas, Km 24.5 Carretera Zacatecas-Fresnillo, Calera, Zacatecas, CP. 98500
Tel: 55-38-71-87-00 ext. 82328

Publicación Electrónica disponible en
la biblioteca digital del INIFAP:

https://vun.inifap.gob.mx/BibliotecaWeb/_Content
www.gob.mx/inifap

Directorio del CE Zacatecas

Dr. Luis Roberto Reveles Torres

Director de Coordinación y Vinculación

Dr. Guillermo Medina García	Agrometeorología y Modelaje
Dra. Nadiezhda Y. Ramírez Cabral	Agrometeorología y Modelaje
MC. José Israel Casas Flores	Agrometeorología y Modelaje
Dr. Alfonso Serna Pérez	Fertilidad de suelos y nutrición vegetal
Dr. Francisco G. Echavarría Cháirez	Fertilidad de suelos y nutrición vegetal
MC. José Ángel Cid Ríos	Fríjol y Garbanzo
MC. Juan José Figueroa González	Fríjol y Garbanzo
MC. Mayra Denise Herrera	Fríjol y Garbanzo
Dr. Jorge A. Zegbe Domínguez	Frutales
MC. Valentín Melero Meráz	Frutales
Ing. Manuel Reveles Hernández	Hortalizas
Dr. Miguel Servín 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
MC. 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
Dra. Blanca I. Sánchez Toledano	Socioeconomía



La aparición de una nueva sintomatología (aborto de flor, necrosis foliar, pérdida de espinas, amarillamiento, deformación y proliferación de cladodios) que afecta la calidad de las plantas de nopal, está asociada con la presencia de fitoplasmas. Para esta enfermedad se tienen muy pocos avances y alternativas para su control, ya que incluso se está en la etapa del correcto diagnóstico de la enfermedad. Es por ello que se establece la necesidad de implementar técnicas de diagnóstico molecular que permitan identificar al o los posibles agentes causales y diseñar estrategias que ayuden a controlar la diseminación de la enfermedad.

