

## PRESENCIA DE FITOPLASMAS EN MALEZA DE AGUASCALIENTES Y ZACATECAS

Gabriela Aguirre-Márquez, Luis Roberto Reveles-Torres, Rodolfo Velásquez-Valle y Mario Domingo Amador-Ramírez

Campo Experimental Zacatecas – INIFAP, Km. 24.5 Carr. Zacatecas – Fresnillo, Calera de V. R., Zacatecas, México. E-mail: [velasquez.rodolfo@inifap.gob.mx](mailto:velasquez.rodolfo@inifap.gob.mx)

### INTRODUCCIÓN

De acuerdo con Amador (2006), las malas hierbas son plantas con alta capacidad para extraer agua del suelo, lo cual señala a este grupo de plantas como un factor de alto grado de competencia para los cultivos que además competirán por luz, nutrientes y espacio. Sin embargo, la población de malas hierbas también representa un riesgo debido a su capacidad de albergar patógenos como virus y fitoplasmas además de sus vectores.

Los fitoplasmas son bacterias que carecen de pared celular, pertenecen a la clase Mollicutes y que viven en los elementos del floema en las plantas infectadas (Meynet *et al.*, 2004). A nivel mundial existen reportes de maleza infectada por diferentes fitoplasmas; en Argentina, Meneguzzi *et al.* (2008) informan que las malas hierbas *Artemisia annua* L. y *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist que mostraban síntomas como escoba de bruja se encontraban infectadas por fitoplasmas del grupo 16SrVII-B. En la República Checa se ha reportado la presencia de plantas de *Chenopodium album* L. infectadas con fitoplasmas pertenecientes a los grupos 16SrIII aunque también se había encontrado al grupo 16SrXII (Safarova *et al.*, 2011); en Italia, Marcone *et al.* (1997) consignaron la presencia de fitoplasmas pertenecientes al grupo de la hoja blanca de la caña de azúcar en malas hierbas como *Crepis setosa* Hall., *Knautia arvensis* (L.) J.M. Coult, *Convolvulus arvensis* L., *Picris echioides* L., *Echium vulgare* L. y *Calendula officinalis* L. En Zacatecas, Mercado-Arteaga *et al.* (2013) señalaron la presencia de fitoplasmas en plantas de *Chenopodium* spp. Las condiciones climatológicas en el área de Aguascalientes y Zacatecas permiten el desarrollo de poblaciones de malas hierbas aún en condiciones invernales que pueden actuar como reservorios de patógenos como los fitoplasmas que más tarde podrían pasar a los vectores que a su vez infectarían cultivos de importancia económica como el chile para secado durante el verano por lo que el propósito del presente trabajo consistió en determinar la presencia de fitoplasmas en diferentes especies de maleza presente durante las épocas de invierno y primavera en los estados de Aguascalientes y Zacatecas, México.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Entre noviembre de 2013 y mayo de 2014 se realizaron recorridos en el área agrícola de los estados de Aguascalientes y Zacatecas para localizar manchones de maleza que presentaran plantas vivas. En cada uno de esos manchones se seleccionaban al azar cinco individuos de cada especie presente. En algunos casos el muestreo se dirigía hacia individuos que mostraban alguna sintomatología asociada con infección por fitoplasmas como escoba de bruja, anomalías en la floración, deformaciones o decoloraciones foliares, etc. las plantas se trasladaban al laboratorio de Biología Molecular del Campo Experimental Zacatecas (INIFAP) para su registro; posteriormente se procedía a obtener una muestra de diferentes órganos de cada planta (principalmente hojas, tallo y raíz) para la extracción de DNA según el protocolo propuesto por Dellaporta *et al.* (1983).

El diagnóstico de la presencia de fitoplasmas se realizó mediante PCR anidada. Se utilizaron los pares de primers universales P1/Tint (Smart *et al.*, 1996) para amplificación directa y R16F2n/R16R2 (Gundersen y Lee, 1996) para la anidación.

La mezcla de reacción fue la siguiente: 2.5  $\mu$ L PCR buffer (10 $\times$ ), 1.5  $\mu$ L MgCl<sub>2</sub> (50mM), 2.5  $\mu$ L dNTPs (20 mM), 0.5  $\mu$ L de cada "primer" (20 pM), 0.15  $\mu$ L Taq polimerasa (5 U por  $\mu$ L), 2.5  $\mu$ L de muestra de DNA (50 ng por  $\mu$ L) y H<sub>2</sub>O miliQ a 25  $\mu$ L. En cuanto a la mezcla de reacción para la PCR anidada se utilizó 1  $\mu$ L de cada PCR directa y a un volumen final de 25  $\mu$ L. Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador (Applied Biosystems) con 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 1 min (95 °C, 3 min para el primer ciclo), alineación a 56 °C por 1 min y extensión a 72 °C por 2 min (5 min para el ciclo final). Los productos de PCR obtenidos fueron reamplificados con 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 1 min (3 min para el primer ciclo), alineación a 55 °C por 2 min y extensión a 72 °C por 2 min, y una extensión final a 72 °C por 5 min. Los productos de PCR fueron fraccionados sobre geles de agarosa 1% a 91 voltios por 45 minutos, teñidos con bromuro de etidio (0.7  $\mu$ g por ml) y visualizados bajo luz ultravioleta. Agua estéril fue utilizada como control negativo.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Se tomaron muestras de maleza en 12 sitios de los cuales tres correspondieron al estado de Aguascalientes y los restantes nueve al de Zacatecas; los muestreos se realizaron durante la temporada invernal y a principios de primavera a fin de obtener información sobre el papel potencial de la maleza como reservorio de fitoplasmas. El sitio de muestreo localizado dentro del Campo Experimental Zacatecas se muestreo en dos ocasiones: en noviembre de 2013 y mediados de enero de 2014.

En total se tomaron muestras de 24 especies de maleza en ambos Estados; las más frecuentes resultaron la mostacilla (*Sysimbrium irio*), malva (*Malva parviflora*) y gualda (*Reseda luteola*); por el contrario, 13 especies de maleza se encontraron en solamente un sitio de muestreo. Las plantas colectadas pertenecían a 12 familias botánicas; cuatro de ellas resultaron positivas a la presencia de fitoplasmas (Cuadro 1).

Cuadro 1. Presencia de fitoplasmas en diferentes familias botánicas y número de especies totales y positivas a fitoplasmas.

Familia	Especies totales colectadas	Especies positivas a fitoplasmas	%
Resedaceae	1	1	100
Amaranthaceae	3	1	33
Chenopodiaceae	3	1	33
Malvaceae	1	0	0
Brassicaceae	6	2	33
Papaveraceae	1	0	0
Geraniaceae	1	0	0
Asteraceae	3	0	0
Solanaceae	1	0	0
Polygonaceae	1	0	0
Boraginaceae	1	0	0
Portulacaceae	1	0	0

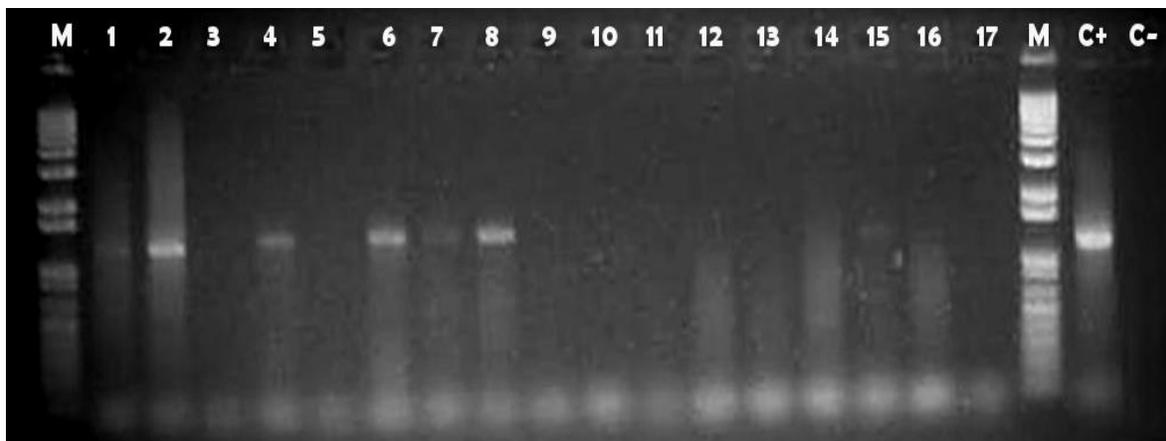
En la mayoría de los casos las plantas colectadas no mostraban síntomas potenciales de la infección por fitoplasmas, sin embargo, se detectaron fitoplasmas en siete de los 12 sitios muestreados; de ellos cinco se localizaron en los municipios de Morelos y Enrique Estrada en Zacatecas y dos en los municipios de Rincón de Romos y San Francisco del Rincón en Aguascalientes. En estos sitios de muestreo generalmente se encontraron entre una y tres especies positivas a la infección por fitoplasmas (Cuadro 2).

Cuadro 2. Especies de maleza muestreada en Aguascalientes y Zacatecas y reacción a la presencia de fitoplasmas

Nombre común	Nombre científico	Familia	Presencia de fitoplasmas
Gualda	<i>Reseda luteola</i> (L.)	Resedaceae	Positiva
Quelite	<i>Amaranthus palmeri</i> S. Wats	Amaranthaceae	Positiva

Quelite cenizo	<i>Chenopodium berlandieri</i> Moq.	Chenopodiaceae	Negativa
Malva o quesoillo	<i>Malva parviflora</i> L.	Malvaceae	Negativa
Mostacilla	<i>Sisymbrium irio</i> L.	Brassicaceae	Positiva
Nabo de campo	<i>Brassicacampestris</i> L.	Brassicaceae	Positiva
Rucola	<i>Eruca sativa</i> Mill.	Brassicaceae	Positiva
Chicalote amarillo	<i>Argemone mexicana</i> L.	Papaveraceae	Negativa
Alfilerillo	<i>Erodium cicutarium</i> (L.) 'Her. Ex Ait.	Geraniaceae	Negativa
Lechuguilla	<i>Sonchus asper</i> (L.) Hill	Asteraceae	Negativa
Trompillo	<i>Solanum eleagnifolium</i> Cav.	Solanaceae	Negativa
Lengua de vaca	<i>Rumex crispus</i> L.	Polygonaceae	Negativa
Nabo de campo	<i>Brassica rapa</i> L.	Brassicaceae	Negativa
Bolsa de pastor	<i>Capsella bursa-pastoris</i> (L.) Medic.	Brassicaceae	Negativa
Quelite	<i>Amaranthus hybridus</i> L. Quintonil	Amaranthaceae	Negativa
Ahuacalillo	<i>Simsia amplexicalis</i> (Cav.) Pers.	Asteraceae	Negativa
Epazote	<i>Chenopodium ambrosioides</i> L.	Chenopodiaceae	Negativa
Rabanillo	<i>Raphanus raphanistrum</i> L.	Brassicaceae	Negativa
Rodadora	<i>Salsola tragus</i> L.	Chenopodiaceae	Negativa
Borraja	<i>Borago officinalis</i> L.	Boraginaceae	Negativa
Verdolaga	<i>Portulaca oleracea</i> L.	Portulacaceae	Negativa
Aceitilla	<i>Bidens odorata</i> Cav.	Asteraceae	Negativa
Quelite	<i>Chenopodium album</i> L.	Chenopodiaceae	Positiva
Quelite	<i>Amaranthus retroflexus</i> L.	Amaranthaceae	Negativa

En general se detectaron fitoplasmas en todos los órganos analizados (raíz, tallo y hojas), sin embargo, el órgano vegetal donde se realizó la detección de esos patógenos con mayor frecuencia, independientemente de la especie, resultaron las hojas (75% de las muestras positivas) seguida por el tallo (33%) mientras que en la raíz solamente en un caso se detectaron fitoplasmas. Los resultados de los bandeos positivos en extractos de hojas se muestran en la Figura 1.



**Figura 1.** Electroforesis en gel de agarosa de los productos amplificados por PCR-anidada de extractos de hojas de 17 especies de malezas. Resultados positivos con la amplificación de una banda de 1600 pb en las líneas 1 (*Reseda luteola* L.), 2 (*Amaranthus palmeri* S. Wats), 4 (*Sisymbrium irio* L.), 6 (*Brassicacampestris* L.), 7 (*Eruca sativa* Mill.) y 8 (*Chenopodium álbum* L.). Resultados negativos en las líneas 3 (*Chenopodium berlandieri* Moq.), 5 (*Malva parviflora* L.), 9 (*Argemone mexicana* L.), 10 (*Erodium cicutarium* L.), 11 (*Sonchus asper* L.), 12 (*Solanum eleagnifolium* Cav), 13 (*Rumex crispus* L.), 14 (*Brassica rapa* L.), 15 (*Capsella bursa-pastoris* L.), 16 (*Amaranthus hybridus* L.) y 17 (*Bidens odorata* Cav). M (1 kb marcador molecular Invitrogen). C+ (control positivo), C- (control negativo).

En cinco de los siete sitios de colecta que presentaron plantas positivas a fitoplasmas se encontraban poblaciones positivas de *R. luteola*, lo cual podría enfatizar la importancia de esta especie como reservorio de esos patógenos. Es necesario considerar que debe completarse la identificación del o los fitoplasmas detectados para confirmar si coinciden con los detectados en hortalizas económicamente importantes en la región como el chile para secado.

### CONCLUSIONES

Una parte de la maleza invernal y de principio de primavera en los estados de Aguascalientes y Zacatecas se encuentra infectada con fitoplasmas.

El órgano donde se detectó con mayor consistencia la presencia de fitoplasmas fueron las hojas aunque también es posible hacerlo en tallos y raíces.

### BIBLIOGRAFÍA

- Amador, R. M. D. 2006. Manejo de Maleza pp. 159 – 176. In: Tecnología de producción de chile seco. Libro Técnico N° 5. Campo Experimental Zacatecas – INIFAP. 224 p.
- Dellaporta, S. L., Wood, J., and Hicks, J. B. 1983. A plant DNA miniprep: version II. Plant Molecular Biology Reporter 1:19-21.
- Gundersen, D., Lee, I., 1996. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. Phytopathologia mediterranea 35, 144-151.
- Marcone C., Ragozzino, A., and Seemüller, E. 1997. Detection and identification of phytoplasmas in yellows-diseased weeds in Italy. Plant Pathology 46:530-537.
- Meneguzzi, N. G., Torres, L. E., Galdeano, E., Guzmán, F. A., Nome, S. F., and Conci, L. R. 2008. Molecular characterization of a phytoplasma of the ash yellows group (16Sr VII-B) occurring in *Artemisia annua* and *Conyzabonariensis* weeds. Agriscientia XXV:7-15.
- Mercado-Arteaga, N. V., Velásquez-Valle, R. y Reveles-Torres, L. R. 2013. Presencia de fitoplasmas en adultos de *Aceratagalliaspp.* y plantas de *Chenopodium spp.* en Zacatecas y Chihuahua, México. Agrofaz 13:125-128.
- Meyn, N. C., Nicolaisen, M., Hansen, M., and Schulz, A. 2004. Distribution of phytoplasmas in infected plants as revealed by real-time PCR and bioimaging. MPMI 17:1175-1184.
- Smart, C.D., Schneider, B., Blomquist, C.L., Guerra, L.J., Harrison, N.A., Ahrens, U., Lorenz, K.H., Seemüller, 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.