

## Detección Molecular de Fitoplasmas en Nopal Tunero (*Opuntia ficus-indica*) con Síntomas de Engrosamiento del Cladodio

### Molecular Detection of Phytoplasmas in Prickly Pear (*Opuntia ficus-indica*) with Thickening of the Cladodio

Alba Suaste Dzul, Reyna Isabel Rojas Martínez, Emma Zavaleta Mejía, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Fitosanidad-Fitopatología, Montecillo, Edo. de México, CP 56230, México, y Daisy Pérez Brito, Centro de Investigación Científica de Yuc., A. C., Laboratorio GeMBio, Colonia Chuburná de Hidalgo, Mérida, Yucatán, CP 97200, México. Correspondencia: rojas@colpos.mx

(Recibido: Diciembre 01, 2011 Aceptado: Febrero 23, 2012)

---

Suaste DA, Rojas MRI, Zavaleta ME y Pérez BD. 2012. Detección molecular de fitoplasmas en nopal tunero (*Opuntia ficus-indica*) con síntomas de engrosamiento del cladodio. Revista Mexicana de Fitopatología 30:72-80.

**Resumen.** Durante 2010 se detectaron en la zona tunera de Nopaltepec, Estado de México, plantas de nopal con síntomas de deformación y engrosamiento del cladodio, mosaico, amarillamiento, proliferación y deformación de frutos en toda la planta o en parte de ella. Dado que el síndrome se ha relacionado con la infección por fitoplasmas, el objetivo de esta investigación fue detectar mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), la presencia de fitoplasmas en diferentes estratos del cladodio y raíz de plantas de nopal. El ADN extraído de las muestras de plantas con síntomas y asintomáticas, se amplificó primero con los iniciadores universales P1/P7 y P1/Tint, y posteriormente mediante PCR anidada utilizando los iniciadores R16F2/R16R2, se obtuvo un fragmento de 1 200 pb en todas las muestras con los síntomas antes mencionados. El análisis de los patrones de restricción generados con las endonucleasas *Hae*III, *Kpn*I y *Mse*I (*TrU*91), reveló que el fitoplasma pertenece al grupo 16SrXIII-Mexican periwinkle virescence.

Palabras clave adicionales: *Mollicutes*, PCR anidada, RFLP-PCR, gen 16S rRNA.

Los fitoplasmas son organismos procariontes sin pared celular, Gram positivos, que se encuentran agrupados en la clase *Mollicutes* (Bertaccini *et al.*, 1999; Hogenhout y Segura, 2010). Hasta el momento no se ha logrado su cultivo *in vitro* por lo que su detección, identificación y clasificación se ha realizado mediante el uso de técnicas moleculares como PCR y RFLP y análisis filogenéticos comparando la secuencia del gen ribosomal 16S (Hodgetts *et al.*, 2007). Los fitoplasmas se han asociado con más de 700 enfermedades de importancia económica en plantas hortícolas, forrajeras, ornamentales y silvestres (Weintraub

**Abstract.** During 2010 in Nopaltepec, Mexico, cactus plants were detected with symptoms of distortion and thickening of the cladode, mosaic, yellowing, proliferation and deformation of fruits in the whole plant or part of it. Since the syndrome has been attributed to phytoplasma infection, the objective of this study was to detect, the presence of phytoplasmas in different strata of the cladode and the roots of cactus plants by Polymerase Chain Reaction (PCR). The DNA extracted from cladodes with symptoms and asymptomatic, was amplified firstly with universal primers P1/P7, and P1/Tint, fragment of phytoplasma 16S rRNA gene, followed by nested PCR using the primers R16F2/R16R2, a fragment of 1 200 bp was obtained. Analysis of restriction patterns generated with endonucleases revealed that the phytoplasma belongs to the Mexican periwinkle virescence-16SrXIII.

Additional Keywords: *Mollicutes*, Nested PCR, RFLP-PCR, 16S rRNA gene.

**Résumé.** En 2010, dans la région de Nopaltepec, État de Mexico, ont été détectés des plants de figue de barbarie présentant des symptômes de déformation et grossissement du cladode, mosaïque, jaunissement et déformation des fruits sur tout ou partie de la plante. Le syndrome a été associé à une infection occasionnée par phytoplasmes. Le but de cette recherche a été d'identifier par réaction en chaîne par polymérase (PCR) la présence de phytoplasmes dans différents strates du cladode et dans la racine des plants de figue de barbarie. L'ADN extrait d'échantillons de plantes présentant des symptômes et de plantes asymptomatiques, a d'abord été amplifié avec des amorces universelles P1/P7 et amorces P1/Tint, puis par PCR nichée en utilisant des amorces R16F2/R16R2. Un fragment de 1200 pb a été obtenu dans tous les échantillons avec les symptômes ci-dessus. L'analyse des profils de restriction générés par les endonucléases *Hae*III, *Kpn*I et *Mse*I (*TrU*91) a révélé que le phytoplasme appartient au groupe 16SRXIII-virescence de la pervenche mexicaine (mexicaine periwinkle virescence).

y Beanland, 2006). En diferentes partes del mundo como Estados Unidos, Italia, China y Líbano se ha reportado la presencia de fitoplasmas en cactáceas (Bertaccini *et al.*, 2007; Cai *et al.*, 2008; Choueiri *et al.*, 2005; Tessitori *et al.*, 2005). En México, algunas ornamentales de *Opuntia* sp. en las que se han detectado fitoplasmas presentan características anatómicas inusuales como son proliferación de brotes, tallos amarillos, mosaicos y coloraciones púrpuras, alteraciones que les confieren un valor económico adicional pues son ofrecidas en altos precios a coleccionistas de cactus en diversos viveros comerciales (Aviña *et al.*, 2009). En la zona de San Martín de la Pirámides, Edo. de México, en el cultivo de nopal tunero (*Opuntia ficus-indica*) se ha reportado una enfermedad conocida como "planta macho" atribuida a la presencia de fitoplasmas (Hernández *et al.*, 2009), en los últimos años se le 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. En el municipio de Nopaltepec, Estado de México, se observaron en plantas de nopal tunero síntomas como: engrosamiento, mosaico y amarillamiento, manchas anulares en cladodios, además de proliferación y deformación de frutos que pudieran estar asociados a la presencia de fitoplasmas. Con base en lo anterior, el objetivo de este estudio fue detectar e identificar mediante PCR-RFLP la presencia de fitoplasmas en nopal tunero con el síndrome descrito.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Material vegetal.** En una huerta comercial de nopal perteneciente a la comunidad de San Felipe Teotitlán, Municipio de Nopaltepec Edo. de México se colectaron cladodios con síntomas de engrosamiento, amarillamiento, mosaico, proliferación y deformación de frutos (Figura 1); así como de cladodios asintomáticos. Se obtuvieron un total de 35 cladodios en los meses de enero y julio de 2011, éstos se embebieron en Radix 10 000® (ácido indol-3-butírico 10 000 ppm) y se sembraron en macetas con suelo estéril y se mantuvieron en el invernadero.

**Extracción del ADN.** Para la extracción de ADN se tomó tejido de la parte superior, media y basal de cada uno de los 35 cladodios colectados con síntomas de engrosamiento, proliferación, deformación de frutos y manchas anulares y de plantas asintomáticas. De las plantas mantenidas en invernadero se tomó tejido radical para llevar a cabo la extracción de ADN.

El ADN se extrajo con el producto DNeasy Mini Kit (QIAGEN®) de la siguiente manera: se pesaron 30-40 mg de tejido y se maceraron con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino sin dejar que la muestra se descongelara. Al tejido macerado se le añadieron 400 µL de buffer de extracción API y se incubó a 65°C en baño de agua (Wheaton Rotary Vacuum Evaporator NE-1) por 10 min con homogenización ocasional. Después se agregaron 130 µL de buffer AP2 y se incubó durante 5 min en hielo, se centrifugó por 5 min a 14 000 rpm en una centrifuga Silent SPIN (Continental Lab Products), el sobrenadante se transfirió a una columna QIA shredder Mini Spin, y se volvió a

Mots clés supplémentaires: *Mollicutes*, PCR nichée, RFLP-PCR, gène ARNr 16S.

Phytoplasmas are Gram-positive prokaryotes without a cell wall, that are grouped in the *Mollicutes* class (Bertaccini *et al.*, 1999; Hogenhout and Segura, 2010). Since it is not yet been achieved, isolate phytoplasmas *in vitro*, their detection, identification and classification has been performed by the use of molecular techniques such as PCR, RFLP and phylogenetic analysis comparing the 16S ribosomal gene sequence (Hodgetts *et al.*, 2007). The phytoplasmas have been associated with more than 700 economically important diseases in vegetable, forage, ornamental and wild plants (Weintraub and Beanland, 2006). The presence of cacti phytoplasmas have been reported in different parts of the world like USA, Italy, China and Lebanon (Bertaccini *et al.*, 2007; Cai *et al.*, 2008; Choueiri *et al.*, 2005; Tessitori *et al.*, 2005). In Mexico, some ornamental *Opuntia* sp. in which phytoplasmas have been detected showed unusual anatomical features such as proliferation of shoots, yellow stems, purple colorations and mosaics, alterations that confer additional economic value as they are offered at high prices to cacti collectors in various commercial nurseries (Aviña *et al.*, 2009). In the zone of San Martín de las Pirámides in the State of Mexico, a disease attributed to the presence of phytoplasmas known as "male plant disease" has been reported in the cultivation of fig opuntia, also referred to as "prickly pear" (*Opuntia ficus-indica*) (Hernández *et al.*, 2009), in recent years it has been considered as the main limiting factor in the production of tunas in the country, since affected plants show deformation, shoot proliferation, thickening and development of the cordate of the cladodes and growth arrest. In the town of Nopaltepec, State of Mexico, symptoms were observed in prickly pear plants such as; thickening, mosaic and yellow ring shaped spots on cladodes, as well as proliferation and deformation of fruits that may be associated with the presence of phytoplasmas. Based on the foregoing, the objective of this study was to detect and identify by PCR-RFLP the presence of phytoplasmas in indian fig opuntia with the described syndrome.

## MATERIALS AND METHODS

**Plant material.** In a commercial cacti orchard belonging to the community of San Felipe Teotitlan, Nopaltepec, State of Mexico cladodes with symptoms of thickening, yellowing, mosaic, proliferation and fruit deformation were collected (Figure 1); as well as asymptomatic cladodes. A total of 35 cladodes were obtained in the months of January and July 2011, these were soaked in Radix 10,000® (indole-3-butyric acid 10,000 ppm) and were planted in pots with sterile soil and kept in a greenhouse.

**DNA extraction.** For the DNA extraction, tissue was taken from the top, middle and the basal parts of each one of the 35 cladodes collected with symptoms of thickening, proliferation, fruit deformation and ring spots and from asymptomatic plants. Root tissue was taken from the plants kept in the greenhouse in order to carry out the DNA

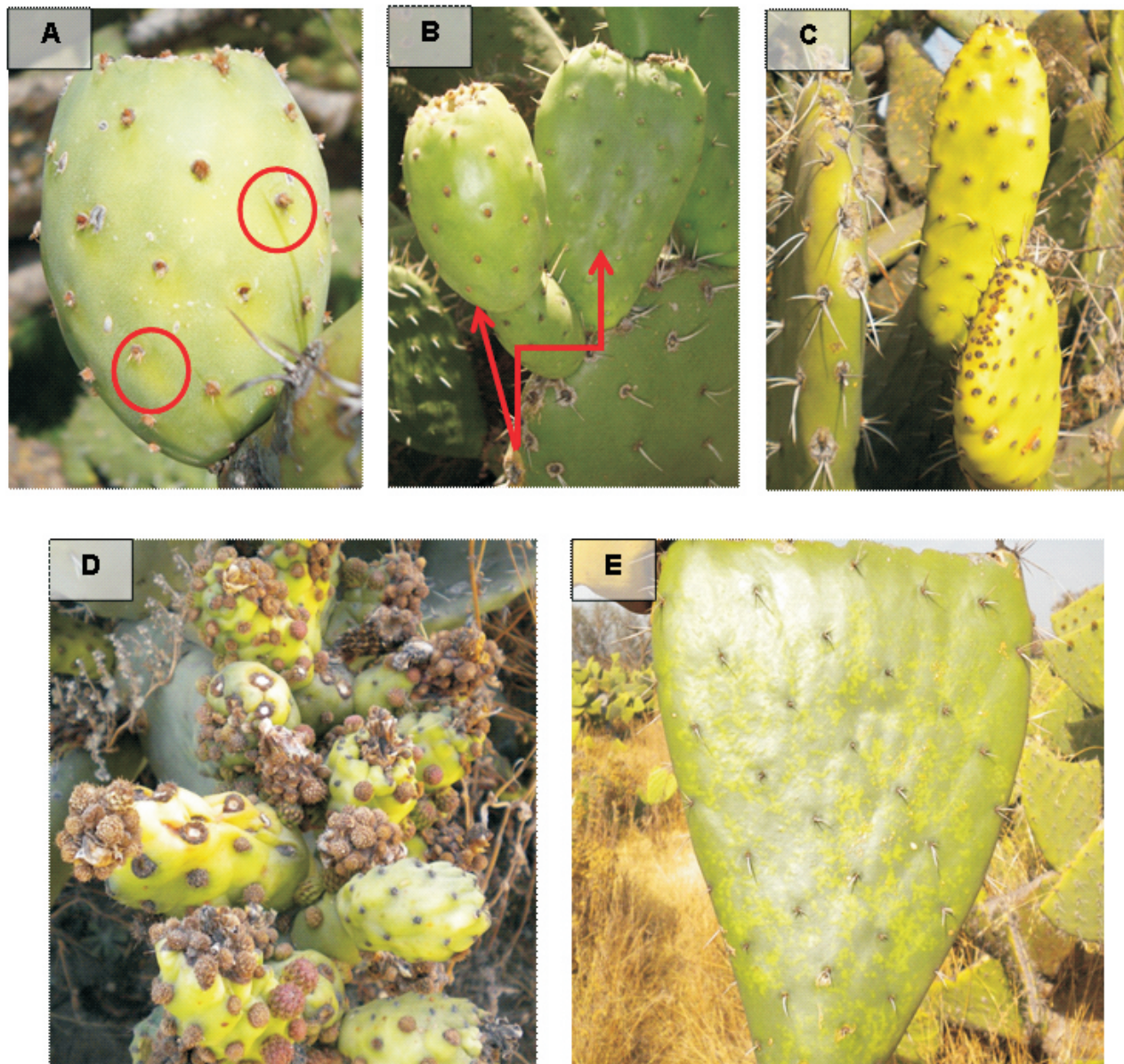


Figura 1. **A.** Síntomas de amarillamiento en fruto. **B.** Deformación del fruto y engrosamiento del cladodio. **C.** Amarillamiento del cladodio. **D.** Proliferación de frutos. **E.** Mosaico en cladodio de nopal tunero.

Figure 1. **A.** Symptoms of yellowing in fruit. **B.** Deformation of the fruit and thickening of the cladode. **C.** Yellowing of the cladode. **D.** Proliferation of fruit. **E.** Mosaic in a fig opuntia cladode.

centrifugar a 14 000 rpm durante 2 min. El nuevo sobrenadante se colocó en un tubo eppendorf estéril. Posteriormente se agregaron 1.5 µl del buffer AP3 y se transfirió a la columna DNeasy Mini Spin, centrifugándose por 1 min a 8 000 rpm. Una vez capturado el ADN, la columna se lavó dos veces en 500 µL del buffer AW y se centrifugó por 2 min a 14 000 rpm. La columna se transfirió a un tubo eppendorf estéril de 1.5 mL, se adicionaron 50 µL de buffer AE (previamente calentado a 65°C), se incubó durante 5 min a temperatura ambiente y se centrifugó por 1 min a 8 000 rpm.

La determinación de la calidad e integridad del ADN

extraction.

The DNA was extracted with the DNeasy Mini Kit (QIAGEN©) in the following manner: 30-40 mg of tissue was weighed and macerated with liquid nitrogen until a fine powder was obtained without letting the sample thaw. 400 µL of AP1 extraction buffer was added to the macerated tissue and incubated at 65°C in a water bath (Wheaton Rotary Vacuum Evaporator NE-1) for 10 min with occasional homogenization. 130 µL of AP2 buffer were then added and incubated in ice for 5 min, it was centrifuged for 5 min at 14,000 rpm in a Silent SPIN centrifuge (Continental Lab Products), the supernatant was transferred to a

se hizo en un gel de agarosa al 1% (p/v) en buffer TAE 1X (Tris acetato-EDTA) mediante electroforesis a 90 V por 40 min y la cuantificación del ADN se realizó en un espectrofotómetro (NanoDrop® ND-1000 V 3.2.1) según el método descrito por Sambrook *et al.* (1989).

**Detección de fitoplasmas por PCR.** Debido a la baja concentración de estos patógenos dentro de la planta, para detectar su presencia es necesario realizar una doble amplificación por PCR. En la primera reacción (PCR directa) se utilizó el par de iniciadores universales P1 (Deng y Hiruki, 1991) y P7 (Schneider *et al.*, 1995) que amplifican un fragmento de 1 800 pb, y la combinación de iniciadores P1/Tint (Smart *et al.*, 1996) que amplifican un fragmento de 1 600 pb, en un volumen de reacción final de 25 µL, que contenía 1X de amortiguador para PCR (10x, 100 mM tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8.3) (Biogénica), 0.2 mM de cada dNTP, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Biogénica), 20 pmol de cada iniciador (Invitrogen®), 1U de ADN polimerasa Amplificasa® (Biogénica) y 200 ng de ADN objetivo. La amplificación se llevo a cabo en un termociclador Techne® TC-300, con un primer paso de desnaturalización a 94 °C por 5 min, seguido por 30 ciclos de 1 min a 94 °C, 1.5 min a 54 °C y 2 min a 72 °C, y un paso final de extensión de 10 min a 72 °C.

Para aumentar la sensibilidad de detección, se realizó una segunda amplificación (PCR anidada) con los iniciadores R16F2/R16R2 (Gundersen y Lee, 1996) que amplifican la región 16S rDNA de los fitoplasmas, como molde se utilizó el ADN el producto de amplificación de la primera reacción de PCR, diluido en agua destilada estéril [1:20 (v/v)] empleándose las mismas concentraciones y reactivos que en la PCR directa. La amplificación se desarrolló en un termociclador Techne® TC-300, iniciando con una desnaturalización de 95 °C por 5 min, seguida de 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 1.5 min a 53 °C y 72 °C durante 1.5 min, y un paso final de 10 min a 72 °C. Los productos de amplificación obtenidos (1 200 pb) se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % (p/v) en amortiguador TAE 1X a 100 V por 50 min, previamente teñido con bromuro de etidio. El marcador de peso molecular empleado como referencia fue de 100 pb (Roche®). Las imágenes del gel se visualizaron y analizaron con luz ultravioleta en un fotodocumentador UV (Bio Rad®, Gel Doc 2000) con el programa QuantityOne 4.1.1. En todos los casos se utilizó como control positivo ADN de coco infectado con el fitoplasma del Amarillamiento Letal del Cocotero (ALC). Como control negativo se utilizó agua bidestilada estéril libre de DNAsas y RNAsas.

**RFLP-PCR.** Para determinar el grupo al cual pertenece el fitoplasma detectado, el fragmento amplificado se sometió a un análisis de RFLP. El fragmento se digirió con las endonucleasas de restricción *AluI*, *HaeII*, *HaeIII*, *KpnI*, *Tru91* y *Tsp5091* (Promega® Madison WI, EU) y los productos de restricción se separaron en geles de agarosa 1.5 % teñidos con bromuro de etidio. Los patrones de RFLP obtenidos se compararon con los reportados en la literatura (Lee *et al.*, 1998).

**Secuenciación y análisis del gen 16 S rDNA.** El producto de la PCR anidada se purificó (Wizard Promega®)

QIAshredder Mini Spin Column, and was once again centrifuged at 14,000 rpm for 2 min. The new supernatant was placed into a sterile eppendorf tube. Subsequently, 1.5 µL of AP3 buffer were added and transferred to the DNeasy Mini Spin Column, being centrifuged for 1 min at 8,000 rpm. Once the DNA was captured, the column was washed twice in 500 µL of AW buffer and was centrifuged for 2 min at 14,000 rpm. The column was transferred to a 1.5 mL sterile eppendorf tube, 50 µL of AE buffer were added (pre-heated to 65 °C), it was incubated for 5 min at room temperature and was then centrifuged for 1 min at 8,000 rpm.

The determination of the quality and integrity of the DNA was made via agarose gel at 1% (w/v) in 1X TAE (Tris-acetate-EDTA) buffer by electrophoresis at 90 v for 40 min and the quantification of the DNA was performed on a spectrophotometer (NanoDrop® ND-1000 V 3.2.1) according to the method described by Sambrook *et al.* (1989).

**Phytoplasma detection through PCR.** Due to the low concentration of these pathogens within the plant, it is necessary to perform a double amplification by PCR to detect their presence. In the first reaction (direct PCR) a pair of universal primers were used, P1 (Deng and Hiruki, 1991) and P7 (Schneider *et al.*, 1995) which amplify a 1800 bp fragment, and the P1/Tint primer combination (Smart *et al.*, 1996) which amplify a 1600 bp fragment in a final reaction volume of 25 µL that contained 1X of PCR buffer (10x, 100 mM tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8.3) (Biogénica), 0.2 mM of each dNTP, 1.5 mM of MgCl<sub>2</sub> (Biogénica), 20 pmol of each primer (Invitrogen®), 1 U of Amplificasa® DNA polymerase (Biogénica) and 200 ng of objective DNA. The amplification was carried out in a Techne® TC-300 thermal cycler, with an initial denaturation step at 94 °C for 5 min, followed by 30 cycles of 1 min at 94 °C, 1.5 min at 54 °C and 2 min at 72 °C, and a final extension step of 10 min at 72 °C.

To increase the detection sensitivity, a second amplification was performed (nested PCR) with primers R16F2/R16R2 (Gundersen and Lee, 1996) that amplify the 16s rDNA region of the phytoplasmas, the product DNA of the amplification of the first PCR reaction was used as a template, diluted in distilled sterile water [1:20 (v/v)] using the same concentrations and reactions as in the direct PCR. The amplification was carried out in a Techne® TC-300 thermal cycler, starting with a denaturation step at 95 °C for 5 min, followed by 35 cycles of 30 s at 94 °C, 1.5 min at 53 °C and 1.5 min at 72 °C, and a final step of 10 min at 72 °C. The amplification products obtained (1200 bp) were analyzed by electrophoresis on 1.5% agarose gel (w/v) in TAE 1X primer at 100 V for 50 min, previously dyed with ethidium bromide. The molecular weight marker used as reference was 100 bp (Roche®). The gel images were viewed and analyzed with ultraviolet light in a UV photo documentation system (Bio Rad®, Gel Doc 2000) with the QuantityOne 4.1.1. program. In all cases, DNA from coconuts infected with phytoplasmas of the Lethal Yellowing Disease of Coconut was used as the positive control and DNAsas/RNAsas-free bi-distilled water was used as the negative control.

**RFLP-PCR.** In order to determine the group to

y se secuenció (Automatic Sequencer 3700xl DNA Analyzer, Applied Biosystem®). Las secuencias del 16S rADN obtenidas se compararon con las de referencia en el GenBank, usando la herramienta BLAST del Centro Nacional de Información Biotecnológica (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

## RESULTADOS

El ADN genómico total de las 35 muestras procesadas mostró buena integridad y calidad con una concentración que varió de 300 hasta 900 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ , lo cual puede considerarse un excelente rendimiento si se tiene en cuenta que la planta de nopal posee grandes cantidades de carbohidratos, compuestos hidrofílicos y mucílago que dificultan la extracción de los ácidos nucleicos (Nobel *et al.*, 1992). Los valores de pureza fueron de 1.7 a 2, indicando mínima presencia de contaminantes, fenoles y taninos, que dificultan la extracción de ADN de calidad e inhiben la reacción de PCR (Tapia *et al.*, 2005). En las muestras provenientes de los diferentes estratos (superior, medio y basal) de los 35 cladodios sintomáticos y asintomáticos no se logró detectar la presencia de fitoplasmas, la detección fue positiva solamente en las muestras de raíces de plantas de nopal.

En la primera reacción de PCR con los iniciadores

which the detected phytoplasma belongs, the amplified fragment was subjected to RFLP analysis. The fragment was digested with the *AluI*, *HaeII*, *HaeIII*, *KpnI*, *Tru91* and *Tsp5091* restriction endonucleases (Promega® Madison WI, USA) and the products of the restriction were separated in agarose (1.5%) gels dyed with ethidium bromide. The obtained RFLP patterns were compared with those reported in literature (Lee *et al.*, 1998).

### Sequencing and analysis of the 16S rDNA gene.

The product of the nested PCR was purified (Wizard Promega®) and sequenced (Automatic Sequencer 3700xl DNA Analyzer, Applied Biosystem®). The obtained sequences of the 16s rDNA were compared against those in the GenBank, using the BLAST tool of the National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

## RESULTS

The total genomic DNA of the 35 samples processed showed good integrity and quality with a concentration ranging from 300 to 900 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ , which can be considered an excellent yield when you consider that the cactus plant has large amounts of carbohydrates, hydrophilic compounds and mucilage which hinder the extraction of nucleic acids (Nobel *et al.*, 1992). The purity values indicated minimal

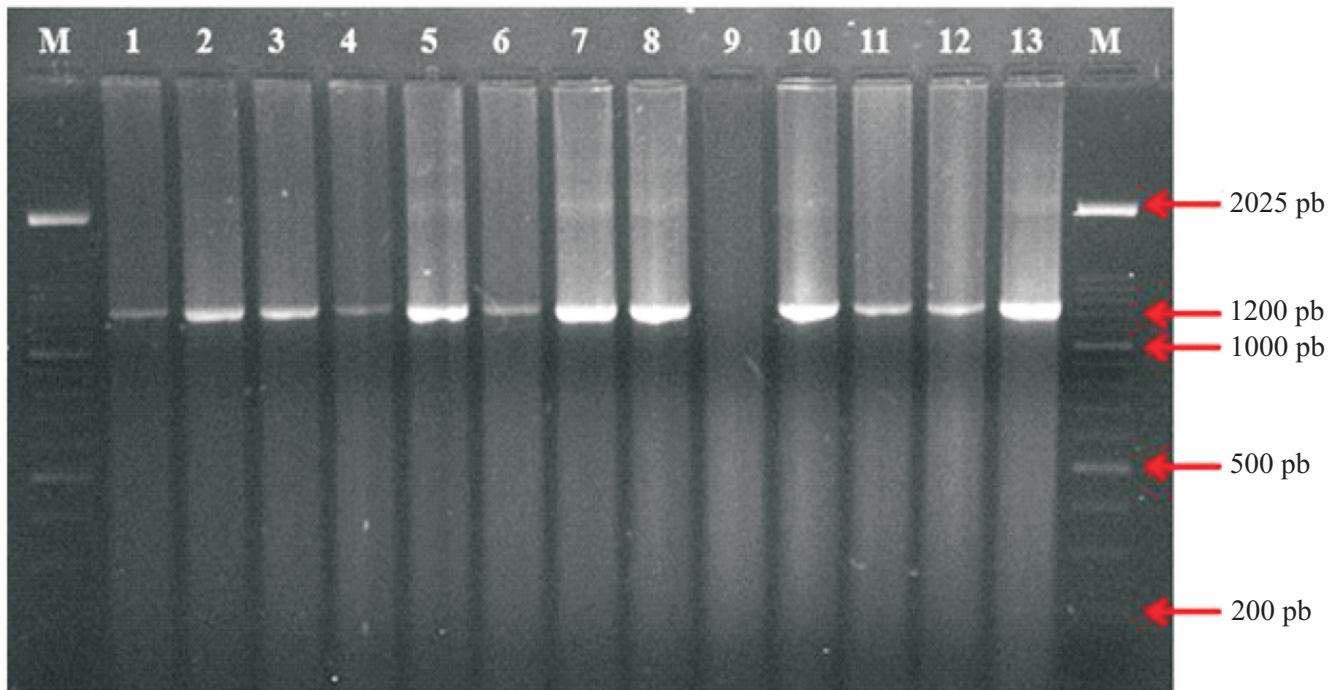


Figura 2. Gel de agarosa al 1% evidenciando los productos de amplificación de la PCR anidada con los iniciadores R16F2/R16R2 para muestras de nopal tunero procedentes de Nopaltepec, Edo. de México. Línea M) Marcador molecular 100 pb; 1-12) muestras Np01, 02, 03, 04, 05, 06, 08, 09, 07, 16, 17 y 26; 13) control positivo ADN de coco infectado con el fitoplasma del Amarillamiento Letal del Cocotero.

Figure 2. One percent agarose gel showing the nested PCR amplification products using primers R16F2/R16R2 for fig opuntia samples from Nopaltepec, State of Mexico. Line M) 100bp molecular marker; 1-12) samples Np01, 02, 03, 04, 05, 06, 08, 09, 07, 16, 17 and 26; 13) Positive control, coconut DNA infected with the phytoplasma of the Lethal Yellowing Disease of Coconut.

P1/P7, se observó el producto de amplificación de 1 800 pb en el control positivo y sólo en cinco de las muestras analizadas.

Con el par de iniciadores P1/Tint, el producto de amplificación esperado de 1 600 pb siempre se obtuvo tanto en las muestras de tejido radical de plantas enfermas como en el control positivo del Amarillamiento Letal del Cocotero (datos no mostrados). En la Figura 2, se observan fragmentos de 1 200 pb obtenidos con PCR anidada que se reportan para establecer la presencia de fitoplasmas sp. (Líneas 1-8, y 10-13), en esta última se ubicó el control positivo para ALC (línea 13). De las 35 muestras de nopal analizadas por PCR anidada en este estudio, 34 resultaron positivas a fitoplasmas sp. (Cuadro 1). La comparación de la secuencia de nucleótidos, utilizando el programa BLAST, del fragmento amplificado con las reportadas en la base de datos del GenBank indicó que el genoma amplificado corresponde a la secuencia nucleotídica de un fitoplasma. El análisis de RFLP obtenidos con las endonucleasas de restricción *HaeIII*, *KpnI* y *MseI* (*TrU91*), indicó que el fitoplasma pertenece al grupo 16SrXIII (Mexican periwinkle virescence) (Lee *et al.*, 1998) (Figura 3).

### DISCUSIÓN

Los síntomas de engrosamiento, proliferación y de formación de frutos han sido asociados a la presencia de fitoplasmas (Bertaccini *et al.*, 2007; Hernández *et al.*, 2009); sin embargo, en las plantas colectadas en la zona tunera de San Felipe Teotitlán, Edo. de México, también se detectó la presencia de virus en muestras de nopal con mosaico y amarillamiento (datos no publicados). Lo anterior indica que la sintomatología observada puede ser producto de la coinfección de las plantas de nopal por virus y fitoplasmas, de ahí que el diagnóstico basado solamente en síntomas puede ser impreciso.

Es bien conocido que los fitoplasmas se encuentran en tejido del floema de la planta y con frecuencia en bajos títulos (Harrison *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 1995; Wei *et al.*, 2000) por lo que en muchas ocasiones no se pueden detectar en la primera PCR, en nuestro caso con el uso del par de iniciadores P1/Tint se logró amplificar siempre el gen ribosomal 16S del fitoplasma en la PCR directa, aunque en algunas casos, el producto de amplificación se observó tenue. La irregularidad en la detección en la primera reacción de amplificación, posiblemente se debió a que el fitoplasma se encontraba en baja concentración (Hodgetts *et al.*, 2007). En el caso de la muestra Np07 no se detectó la presencia del fitoplasma ni en la PCR directa ni en la PCR anidada a pesar de presentar el síntoma de engrosamiento, lo cual pudiera deberse a la baja titularidad del patógeno en la planta. La dificultad para detectar al fitoplasma en los cladodios del nopal se puede explicar porque la distribución de los mismos en la planta varía según la época del año. En el caso del declinamiento del peral (Pear Decline Phytoplasma) ocasionado por fitoplasmas se ha observado que éstos ya no se detectan en las partes aéreas de los árboles durante los meses de invierno debido a las bajas temperaturas y que sobreviven en las raíces nuevas para recolonizar el tallo y las ramas en la primavera siguiente.

Cuadro 1. Relación de muestras de nopal tunero con diferentes síntomas y resultados de la detección de fitoplasmas por PCR.

Table 1. List of prickly pear samples with different symptoms and results of phytoplasma detection by PCR.

Clave	Síntoma	Fitoplasma
Np01	Engrosamiento	+
Np02	Asintomática	+
Np03	Asintomática	+
Np04	Asintomática	+
Np05	Proliferación	+
Np06	Proliferación	+
Np07	Engrosamiento	-
Np08	Engrosamiento y amarillamiento	+
Np09	Engrosamiento y mosaico	+
Np10	Mosaico y proliferación	+
Np11	Amarillamiento	+
Np12	Mosaico	+
Np13	Mosaico y deformación cladodio	+
Np14	Asintomática	+
Np15	Engrosamiento y mosaico	+
Np16	Engrosamiento y mosaico	+
Np17	Engrosamiento y deformación de frutos	+
Np18	Engrosamiento	+
Np19	Engrosamiento y deformación de frutos	+
Np20	Engrosamiento y mosaico	+
Np21	Amarillamiento	+
Np22	Mosaico	+
Np23	Engrosamiento y mosaico	+
Np24	Engrosamiento y mosaico	+
Np25	Mosaico	+
Np26	Mosaico	+
Np27	Engrosamiento y mosaico	+
Np28	Engrosamiento y deformación de frutos	+
Np29	Amarillamiento y deformación de frutos	+
Np30	Mosaico	+
Np31	Engrosamiento y amarillamiento	+
Np32	Engrosamiento y mosaico	+
Np33	Engrosamiento y mosaico	+
Np34	Mosaico y proliferación	+
Np35	Amarillamiento	+

presence of polysaccharides, phenoles and tannins, which makes difficult the extraction of quality DNA difficult and inhibit the PCR reaction (Tapia *et al.*, 2005). In the samples from the different levels (upper, middle and base) of the 35 symptomatic and asymptomatic cladodes, detection of the presence of phytoplasma was not achieved, detection was positive only in samples from the roots of the cacti.

In the first PCR reaction with the P1/P7 primers, the amplification product of 1800 bp was observed in the positive control and only in five of the analyzed samples.

With the P1/Tint primer pair, the expected amplification product of 1600 bp was always obtained in the radical tissue samples of sick plants as well as in the positive

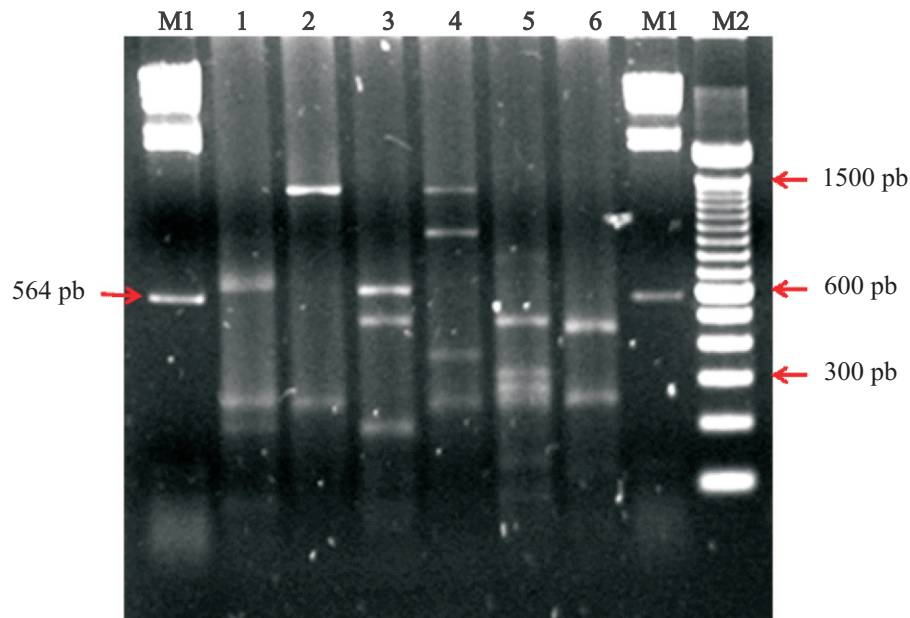


Figura 3. Carriles 1-6. Análisis de los patrones de restricción (RFLP-PCR) a partir de los productos de amplificación de la PCR anidada (R16F2/R16R2) para muestras de nopal tunero con síntomas de engrosamiento, mosaico, amarillamiento, proliferación y deformación de frutos del cladodio procedentes de Nopaltepec, Edo. de México. Los productos de PCR fueron digeridos con *AluI* (línea 1), *HaeII* (2), *HaeIII* (3), *KpnI* (4), *TrU91* (5), *Tps5091* (6). Línea M1: Marcador molecular Lambda DNA digerido con *HindIII*. Línea M2: Marcador molecular 100 pb.

Figure 3. Lanes 1-6. Analysis of restriction patterns (RFLP-PCR) from the nested PCR amplification (R16F2/R16R2) for fig opuntia samples with symptoms of thickening, mosaic, yellowing, proliferation and deformation of fruit of the cladodes from Nopaltepec in the State of Mexico. The PCR products were directed with *AluI* (line 1), *HaeII* (2), *HaeIII* (3), *KpnI* (4), *TrU91* (5), *Tps5091* (6). Line M1: Lambda molecular DNA marker directed with *HindIII*. Line M2: 100 bp molecular marker.

Este comportamiento se explica por la nula producción de nuevos elementos cribosos y la disminución considerable de la actividad de los elementos maduros durante el invierno (Errea *et al.*, 2002). El Mulberry Dwarf Phytoplasma tampoco se detecta durante el invierno en los órganos reproductores y las yemas de árboles de mora pero sí en las raíces (Jian *et al.*, 2004).

Es importante destacar que en las cuatro muestras de nopal asintomáticas también se encontraron fitoplasmas, por lo que es necesario emplear técnicas moleculares para la detección precisa y confiable de este tipo de patógenos, sobre todo durante el proceso de obtención de material propagativo para el establecimiento de nuevas plantaciones. En campo, la presencia de plantas asintomáticas puede tener implicaciones importantes en el progreso temporal y espacial de la enfermedad. El síntoma de engrosamiento del cladodio se reportó por vez primera en México y posteriormente se encontró en Sudáfrica e Italia, sin que se conociera al agente causal (Pimienta, 1990); otros síntomas mostrados por las plantas afectadas incluían proliferación de flores, deformación y amarillamiento de cladodios jóvenes. Hernández *et al.* (2009) reportaron que el fitoplasma asociado con el síndrome de engrosamiento y proliferación del nopal tunero en San Martín de las Pirámides, Estado de México, pertenece al grupo 16SrII, mientras que en la

control of the Lethal Yellowing Disease of Coconut (LYC) (data not shown). In Figure 2, 1200 bp fragments are observed, obtained with Nested PCR, that are reported to establish phytoplasma sp. presence (Lines 1-8, and 10-13), the positive control for the LYC was placed in the last (line 13). Of the 35 cactus samples analyzed by Nested PCR in this study, 34 were positive for phytoplasmas sp. (Table 1). The nucleotide sequence comparison using the BLAST program of the amplified fragment with those reported in the GenBank database indicated that the amplified genome corresponds to the nucleotide sequences of a phytoplasma. The RFLP analysis obtained with the *HaeIII*, *KpnI* and *MseI* (*TrU91*) restriction endonucleases indicated that the phytoplasma belongs to the 16SeXIII group (Mexican periwinkle virescence) (Lee *et al.*, 1998) (Figure 3).

## DISCUSSION

The symptoms of thickening, proliferation and deformation of the fruit have been associated to the presence of phytoplasmas (Bertaccini *et al.*, 2007; Hernández *et al.*, 2009); however, in the plants collected in the cacti orchard zone of San Felipe Teotitlan, in the State of Mexico, the presence of virus was detected in cacti samples with mosaic and yellowing symptoms (data not published). The previous fact indicated that the observed symptomatology may be

presente investigación la secuencia obtenida correspondió al grupo 16SrXIII; esto sugiere que más de un grupo de fitoplasmas puede estar asociado con esta enfermedad.

### CONCLUSIONES

En cladodios de nopal con síntomas de engrosamiento, proliferación, mosaico y amarillamiento provenientes del municipio de Nopaltepec, Edo. de México, se detectó mediante PCR de manera consistente la amplificación del genoma de fitoplasmas, la comparación de secuencias y el análisis de RFLP indicó que se trata de un fitoplasma del grupo 16SrXIII.

**Agradecimientos.** Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgar beca al primer autor del artículo durante los estudios de maestría.

### LITERATURA CITADA

- Aviña PK, Parra CF, Ochoa SJC, Perales SC and Martínez SJP 2009. Phytoplasmas associated to diseases of ornamental cacti in Mexico. *Journal of Biological Sciences* 9:268-271.
- 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.
- Bertaccini A, Fránová J, Paltrinieri S, Martín M, Navrátil L, Nebesárova C and Simkova J. 1999. Leek proliferation: a new phytoplasma disease in the Czech Republic and Italy. *European Journal of Plant Pathology* 105:487-493.
- 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. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58:1448-1457.
- Choueiri E, Massad R and Jreijiri F. 2005. First report of a 16SrII group phytoplasma associated with shoot proliferation of a cactus (*Opuntia monacantha*) in Lebanon. *Plant Disease* 89:1129-1129.
- Deng S, and Hiruki C. 1991. Genetic relatedness between two nonculturable mycoplasma-like organisms revealed by nucleic acid hybridization and polymerase chain reaction. *Phytopathology* 81:1475-1479.
- Gundersen DE and Lee IM. 1996. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathologia Mediterranea* 35:144-151.
- Harrison NA, Myrie W, Jones P, Carpio ML, Castillo MM, Doyle M, and Oropeza C. 2002. 16S rRNA interperon sequence heterogeneity distinguishes strain populations of palm lethal yellowing phytoplasma in the Caribbean region. *Annals of the Applied Biology* 141:183-193.
- Hernández PR, Noa CJC, Gaspar R, Mata P and Flores EN. 2009. Detection of phytoplasma on indian fig (*Opuntia ficus-indica* Mill) in Mexico central region. *OnLine Journal of Biological Sciences* 9:62-66.
- Hodgetts J, Ball T, Boonham N, Mumford R and Dickinson M. 2007. Use of terminal restriction fragment length

product of the co-infection of cacti plants by virus and phytoplasmas, therefore the diagnostic based solely on symptoms may be imprecise.

It is well known that phytoplasma are found in the ploem of the plant and frequently in very low concentrations (Harrison *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 1995; Wei *et al.*, 2000) for which in many occasions they cannot be detected in the first PCR, in our particular case and with the use of the primer pair P1/Tint, the ribosomal 16S gene of the phytoplasma was always successfully amplified in the direct PCR although in some cases the amplification product was very dim. The variation in the detection in the first amplification reaction was possibly due to the fact that the phytoplasma was found in a very low concentration (Hodgetts *et al.*, 2007). In the case of sample Np07 the presence of phytoplasma was not detected in the direct PCR nor in the nested PCR in spite of presenting symptoms of thickening, which could be due to the low concentration of the pathogen in the plant. The difficulty to detect the phytoplasma in the cacti cladodes can be explained by their distribution in the plant which varies according to the season of the year. In the case of the Pear decline produced by phytoplasmas, it has been observed that these are not detected anymore in the aerial parts of the trees during the winter months due to the low temperatures and that they survive in the new roots in order to re-colonize the stalk and branches the following spring. This behavior is explained by the null production of new sieve elements and the considerable reduction of the activity of the mature elements during winter (Errea *et al.*, 2002). The Mullberry Dwarf Phytoplasma is also not detected during winter in the reproductive organs and the buds of blackberry trees, but are detected in the roots (Jian *et al.*, 2004).

It is important to point out that in the four samples of asymptomatic cactus, phytoplasmas were also detected, because of this, it is necessary to employ molecular techniques for the precise and trustworthy detection of this type of pathogens, above all during the obtention of propagation material for the establishment of new plantations. In the field, the presence of asymptomatic plants may have important implications in the time-space progress of the disease. The thickening of the cladode was a symptom that was reported for the first time in Mexico and later found in South Africa and Italy, although no causal agent was known at that time (Pimienta, 1990); other symptoms shown by the affected plants included proliferation of the flowers, deformation and yellowing of young cladodes. Hernández *et al.* (2009) reported that the phytoplasma associated with the thickening and proliferation syndrome of the fig *Opuntia* in San Martin de las Piramides, State of Mexico, belonged to the 16SrII group, whilst in the present investigation the obtained sequence corresponded to the 16SrXIII group; this suggests that more than one group of phytoplasma may be associated with the disease.

### CONCLUSIONS

In prickly pear cladodes with symptoms of thickening, proliferation, mosaic and yellowing from the town of Nopaltepec in the State of Mexico, the amplification of the phytoplasma genome was detected through PCR in a



- polymorphism (T-RFLP) for identification of phytoplasmas in plants. *Plant Pathology* 56:357-365.
- Hogenhout SA and Segura M. 2010. Phytoplasma genomics, from sequencing to comparative and functional genomics-What have we learnt?.pp.19. In: P.G. Weintraub, and P. Jones (eds.). *Phytoplasmas: Genomes, Plant Hosts and Vectors*. Vol. I. CAB International. Cambridge, Massachusetts, USA. 331 p.
- Jiang H, Wei W, Saiki T, Kawakita H, Watanabe K and Sato M. 2004. Distribution patterns of mulberry dwarf phytoplasma in reproductive organs, winter buds, and roots of mulberry trees. *Journal of General Plant Pathology* 70:168-173.
- Lee IM, Gundersen-Rindal D, Davis RE and 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.
- Lee IM, Bertaccini A, Vibio M and Gundersen DE. 1995. Detection of multiple phytoplasmas in perennial fruit trees with decline symptoms in Italy. *Phytopathology* 85:728-735.
- NCBI, National Center for Biotechnology Information. 2011. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>. Bethesda MD, USA. (Consulta, noviembre 2011).
- Nobel PS, Cavalier J and Andrade J.L. 1992. Mucilage in cacti: its apoplastic capacitance, associated solutes, and influence on tissue water relations. *Journal of Experimental Botany* 43: 641-648.
- Pimienta BE 1990. *El nopal tunero*. Primera edición. Universidad de Guadalajara. CECSA Guadalajara, Jalisco, México. 246 p.
- Sambrook DJ, Fritsch EF and Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Third edition. Vol. I. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA. 728 p.
- consistent manner, the sequence comparison and RFLP analysis indicated that it is a phytoplasma from the 16SrXIII group.
- Acknowledgements.** To CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) for the scholarship granted to the first author of the article.
- 
- Schneider B, Seemüller E, Smart CD and Kirkpatrick BC. 1995. Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas. Pp.369-379. In: S. Razin S and Tully JG (eds.). *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasma*. Vol. I. Academic Press, New York, USA. 483 p.
- Smart CD, Schneider B, Blomquist CL, Guerra LJ, Harrison NA, Ahrens U, Lorenz KH, Seemüller E and Kirkpatrick BC. 1996. Phytoplasma specific PCR primers based on sequence of the 16S-23S rRNA spacer region. *Applied and Environmental Microbiology* 62:2988-2993.
- Tapia TR, Quijano RA, Rojas HR, Larqué SA and Pérez BD. 2005. A fast, simple and reliable high-yielding method for DNA extraction from different plant species. *Molecular Biotechnology* 31:137-139.
- Tessitori M, Masenga V and Marzachi C. 2005. First report of a phytoplasma associated with abnormal proliferation of cladodes in cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) in Italy. *Plant Disease* 11:47.
- Wei W, Kawakita H and Sato M. 2000. Detection of a small population of mulberry dwarf (MD)-phytoplasmas in symptomless-mulberry trees by nested PCR. *Journal of Sericultural Science of Japan* 69:261-269.
- Weintraub PG and Beanland L. 2006. Insect vectors of phytoplasmas. *Annual Review of Entomology* 51:91-111.