

Phyllody of daisy (*Dimorphotheca sinuata*) associated to *Candidatus* phytoplasma asteris

Filodia de la margarita (*Dimorphotheca sinuata*) asociada a *Candidatus* phytoplasma asteris

Candelario Ortega-Acosta, Daniel Leobardo Ochoa-Martínez, Reyna Isabel Rojas-Martínez*, Postgrado en Fitosanidad-Fitopatología, Colegio de Postgraduados, Carretera México-Texcoco Km 36.5, Montecillo, Texcoco 56230, Estado de México, México, Jorge A. Gutiérrez-Gallegos, Herbario JES, Área de Biología, Departamento de Preparatoria Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco, 56230, Estado de México.*Autor para correspondencia: rojas@colpos.mx

Recibido: 17 de Mayo, 2019.

Aceptado: 31 de Julio, 2019.

Ortega-Acosta C, Ochoa-Martínez DL, Rojas-Martínez RI and Gutiérrez-Gallegos JA. 2019. Phyllody of the margarita (*Dimorphotheca sinuata*) associated to *Candidatus* phytoplasma asteris. Mexican Journal of Phytopathology 37(3): 444-453.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1905-3

Primera publicación DOI: 14 de Agosto, 2019.

First DOI publication: August 14, 2019.

Resumen. En Montecillo Texcoco, Estado de México se observaron plantas de margarita (*Dimorphotheca sinuata*) exhibiendo síntomas de filodia, virescencia y proliferación de ramas axilares putativos a los inducidos por fitoplasmas. Por lo que el objetivo de esta investigación fue detectar el fitoplasma asociado a estos síntomas mediante PCR con los iniciadores P1/P7 y R16F2n/R2. Se detectó la presencia de fitoplasmas en tejido foliar sintomático. El producto de PCR de 1200 pb obtenido de la PCR se secuenció y sometió a digestión con las

Abstract. In Montecillo Texcoco, State of Mexico we observed daisy plants (*Dimorphotheca sinuata*) showing symptoms of phyllody, virescence and proliferation of axillary branches, all those induced by phytoplasmas. Therefore, the objective of this investigation was to detect the phytoplasma associated with these symptoms by PCR with primers P1/P7 and R16F2n/R2 (nested PCR). The 1200 bp PCR product was obtained from the PCR and it was digested with the restriction enzymes MseI (Tru91), AluI, KpnI and HaIII and restriction maps showed that the phytoplasma present in *Dimorphotheca sinuata* is *Candidatus* phytoplasma asteris (16Sr1-B). The sequences were deposited on the NCBI data base and had a similarity of 99% with *Candidatus* phytoplasma asteris group 16Sr1-B from Iran (MH638316.1). A phylogenetic analysis was performed with the Neighbour-Joining method in which the phytoplasm from daisy was grouped with *Candidatus* phytoplasma asteris. According to the symptoms observed in the field, analysis of restriction patterns, sequencing and phylogeny, the

enzimas de restricción *MseI* (*Tru91*), *AluI*, *Kpn1* y *HaIII*, los patrones de restricción evidenciaron que el fitoplasma presente en *Dimorphotheca sinuata* es *Candidatus* phytoplasma asteris (16SrI). Las secuencias obtenidas fueron depositadas en la base de datos del NCBI y tuvieron una similitud del 99% con *Candidatus* phytoplasm asteris grupo 16SrI-B de Irán (MH638316.1). Se realizó un análisis filogenético con el método de Neighbour-Joining, en el cual el aislamiento detectado en margarita, se agrupó con *Candidatus* phytoplasma asteris. De acuerdo con los síntomas observados en campo, análisis de patrones de restricción, secuenciación y filogenia, indican que la filodia en margarita está asociada a *Candidatus* phytoplasma asteris, relacionado filogenéticamente al grupo 16SrI-B.

Palabras clave: Reversión floral, RFLP, secuenciación, fitoplasmas

Los fitoplasmas son bacterias no cultivables carentes de pared celular pertenecientes a la clase Mollicutes (Weisburg *et al.*, 1989), son responsables de cientos de enfermedades en plantas cultivadas y arvenses en todo el mundo (Lee y Gundersen-Rindal, 2000). Estos patógenos están restringidos al floema, se transmiten por injerto y mediante insectos vectores (Weintraub y Beanland, 2006) y semilla (Rojas-Matínez *et al.*, 2009). Los fitoplasmas infectan sistémicamente a sus hospedantes al moverse a través de los poros de las placas del floema distribuyéndose por todo su sistema vascular (Lee y Gundersen-Rindal, 2000). A la fecha, estos microorganismos no se cultivan en un medio libre de células, lo cual sugiere que tienen un metabolismo más reducido que otros mollicutes como se ha evidenciado en los genomas de fitoplasmas que a la fecha se han secuenciado (Oshima *et al.*, 2004).

Los fitoplasmas inducen una variedad de síntomas entre los que se incluyen, amarillamientos,

phyllody of daisy is associated with *Candidatus* phytoplasma asteris, phylogenetically related to the 16SrI-B group.

Key words: Floral reversion, RFLP, sequencing, phytoplasmas.

Phytoplasmas are non-cultivable bacteria with no cell walls, belonging to the class Mollicutes (Weisburg *et al.*, 1989), and are responsible for hundreds of diseases in cultivated plants and weeds around the world (Lee and Gundersen-Rindal, 2000). These pathogens are restricted to the phloem, are transmitted by grafting and by insects (Weintraub and Beanland, 2006), as well as by seed (Rojas-Matínez *et al.*, 2009). Phytoplasmas systematically infect their hosts by moving through the pores of the plates of the phloem, distributing throughout their vascular system (Lee and Gundersen-Rindal, 2000). So far, these microorganisms are not cultivated in a free cell medium, which suggests that they have a more reduced metabolism than other mollicutes, as observed in the genomes of phytoplasmas that have been sequenced to date (Oshima *et al.*, 2004).

Phytoplasmas induce a variety of symptoms, including yellowing, delay in growth, sterility of flowers, necrosis, witch's broom, phyllody and virescence, among others (Rojas *et al.*, 2013). The three latter symptoms suggest that phytoplasmas interfere with the metabolism of plant hormones (Weintraub and Bealand, 2006). The severity of symptoms depends of the phytoplasma isolate, the age of the plant and the moment in which the infection occurs.

The interaction of phytoplasmas with their vector insects is complex and implies its intra- and extra-cellular replication in the intestine, salivary glands, epithelial and muscular tissues and other organs. The systemic infection of the

retraso del crecimiento, esterilidad de las flores, necrosis, escoba de bruja, filodia y virescencia entre otros (Rojas *et al.*, 2013). Estos tres últimos síntomas sugieren que los fitoplasmas interfieren con el metabolismo de las hormonas vegetales (Weintraub y Bealand, 2006). La severidad de los síntomas depende del aislamiento, la edad de la planta y el momento en que ocurre la infección.

La interacción de los fitoplasmas con sus insectos vectores es compleja e implica su replicación intra y extracelular en el intestino, glándulas salivales, tejidos epiteliales, musculares y otros órganos. La infección sistémica de los fitoplasmas dentro del insecto puede tomar diez días o más dependiendo del grupo, la especie de insecto y la temperatura (Sugio y Hogenhout, 2012). Considerando que hay evidencia de que algunos fitoplasmas se transmiten verticalmente en sus insectos vectores (Weintraub y Bealand, 2006), los medios predominantes de supervivencia más efectiva es por esta vía. Los insectos que pueden ser vectores de estos patógenos pertenecen principalmente a las familias Cicadellidae, Fulgoridae y Psilidae en menor grado (Weintraub y Bealand, 2006).

A la fecha se tienen totalmente secuenciados cuatro genomas de fitoplasmas entre ellos el causante del amarillamiento del áster (*Candidatus Phytoplasma asteris*) quien tiene una amplia gama de hospedantes y son transmitidos por diferentes insectos polípagos. Diversos factores contribuyen a la reducción del genoma de fitoplasmas, incluidos tamaños poblacionales pequeños, asexualidad, un sesgo mutacional que favorece las eliminaciones frente a las inserciones, un entorno de crecimiento metabólicamente rico y, por último, la ausencia de flujo del genoma de otras fuentes debido tanto el ambiente intracelular restringido como la incapacidad de incorporar ADN extraño por recombinación (Bai *et al.*, 2006). A pesar de que los fitoplasmas están sujetos a la mayoría de estos factores, no están restringidos a un único insecto y las poblaciones pueden consistir en múltiples variantes de

phytoplasmas inside the insect may take ten days or more, depending on the group, the species of the insect, and temperature (Sugio and Hogenhout, 2012). Considering that there is evidence that some phytoplasmas are transmitted vertically in their vector insects (Weintraub and Bealand, 2006), the most effective means of survival is by this way. The insects that can be vectors of these pathogens belong mainly to the families of Cicadellidae, Fulgoridae and Psilidae in smaller numbers. (Weintraub and Bealand, 2006).

So far there are four phytoplasma genomes completely sequenced, including the causal agent of Aster yellows (*Candidatus Phytoplasma asteris*), which has a wide range of hosts and is transmitted by different polyphagous insects. Several factors contribute to the reduction of the phytoplasma genome, including small population sizes, asexuality, a mutational bias that favors eliminations over insertions, an environment metabolically rich of growth, and finally, the absence of a flow of the genome from other sources, due both to the restricted intracellular environment as well as the inability to incorporate foreign DNA by recombination (Bai *et al.*, 2006). Although the phytoplasmas are subjected to most of these factors, they are not restricted to a single insect, and populations can consist of multiple phytoplasma variants (Weintraub and Bealand 2006). In particular, the phytoplasmas that colonize many plants and insects are more prone to find other phytoplasmas and organisms that constitute sources for the acquisition of genetic elements.

Due to the economic importance of these pathogens and to the scarce knowledge on vector insect species in Mexico, it is necessary to know weeds and/or ornamental plants with the potential of becoming reservoirs of these pathogens and contribute to the knowledge on them. Therefore, the aim of this investigation was to identify the phytoplasma that induces phyllody in daisy plants (*Dimorphotheca sinuata*).

fitoplasma (Weintraub y Bealand 2006). En particular, los fitoplasmas que colonizan muchas plantas e insectos son más propensos a encontrar otros fitoplasmas y organismos que constituyen fuentes para la adquisición de elementos genéticos.

Debido a la importancia económica de estos patógenos y al poco conocimiento que se tiene de las especies de insectos vectores en México, es necesario conocer las plantas arvenses y/u ornamentales con potencial para ser reservorios de estos patógenos y contribuir a su conocimiento. Por lo que la presente investigación tuvo como objetivo, identificar el fitoplasma asociado a la filodia en margarita (*Dimorphotheca sinuata*).

Extracción de ADN. Se realizó a partir de hojas en cinco plantas con síntomas de filodia, (Figura 1), la toma de muestras fue dirigida a plantas que presentaban este síntoma; así como de dos plantas asintomáticas como testigo. El método que se utilizó para la extracción de ADN fue el reportado por Dellaporta *et al.* (1983) con algunas modificaciones.

Detección de fitoplasmas por PCR. Se realizó PCR anidada con los iniciadores universales P1 (Deng y Hiruki, 1991) y P7 (Kirkpatrick *et al.*, 1994) para fitoplasmas que amplifican un fragmento de 1800 pb (primera amplificación) en un volumen final de 25 µL que contenía: 1 X de amortiguador para PCR (10 X, 100 mM tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8.3) (Invitrogen®), 0.2 mM de cada dNTP, 1.5 mM de MgCl₂ (Invitrogen®), 10 pmol de cada iniciador (Sigma-Aldrich®), 1 U de ADN polimerasa (Invitrogen®) y 100 ng de ADN molde. La amplificación fue realizada en un termociclador Techne®. TC-300 con el siguiente programa: desnaturalización a 94 °C por 5 min, seguido por 35 ciclos de 94 °C por 1 min, 55 °C por 2 min, 72 °C por 3 min con una extensión final de 72 °C por 5 min. La segunda amplificación (anidada) se

DNA extraction. DNA was extracted from leaves in five plants with symptoms of phyllody, (Figure 1); as well as from two asymptomatic plants as a control. The method used for the extraction of DNA was the reported by Dellaporta *et al.* (1983) with some modifications.

Detection of phytoplasmas by PCR. Nested PCR was carried out using universal primers P1 (Deng and Hiruki, 1991) and P7 (Kirkpatrick *et al.*, 1994) for phytoplasmas that amplify a fragment of 1800 pb (first amplification) in a final volume of 25 µL that contained 1 X of PCR buffer (10 X, 100 mM tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8.3) (Invitrogen®), 0.2 mM of every dNTP, 1.5 mM of MgCl₂ (Invitrogen®), 10 pmol of each primer (Sigma-Aldrich®), 1 U of DNA (Invitrogen®) and 100 ng of DNA template. The amplification polymerase was carried out in a Techne® thermocycler TC-300 with the following program: denaturalization at 94 °C for 5 min, followed by 35 cycles at 94 °C for 1 min, 55 °C for 2 min, 72 °C for 3 min with a final extension of 72 °C for 5 min. The second amplification (nested) was carried out using primers R16F2n / R16R2 (Gundersen and Lee, 1996) that amplify a fragment of 1200 pb of the region 16S rADN of the phytoplasmas. As a template DNA, we used the amplified product of the first reaction of PCR diluted in sterile water, free of nucleases (1:20) using the same concentrations and reactants than in direct amplification, with the following program: denaturalization at 94 °C for 2 min, followed by 35 cycles at 94 °C for 1 min, 58 °C for 2 min, 72 °C for 3 min and a final extension at 72 °C for 10 min.

Sequencing and phylogenetic analysis. The product obtained from PCR was purified and sequenced (Macrogen Inc. Korea) in both directions. The sequences obtained were analyzed, deposited and compared with those included in the

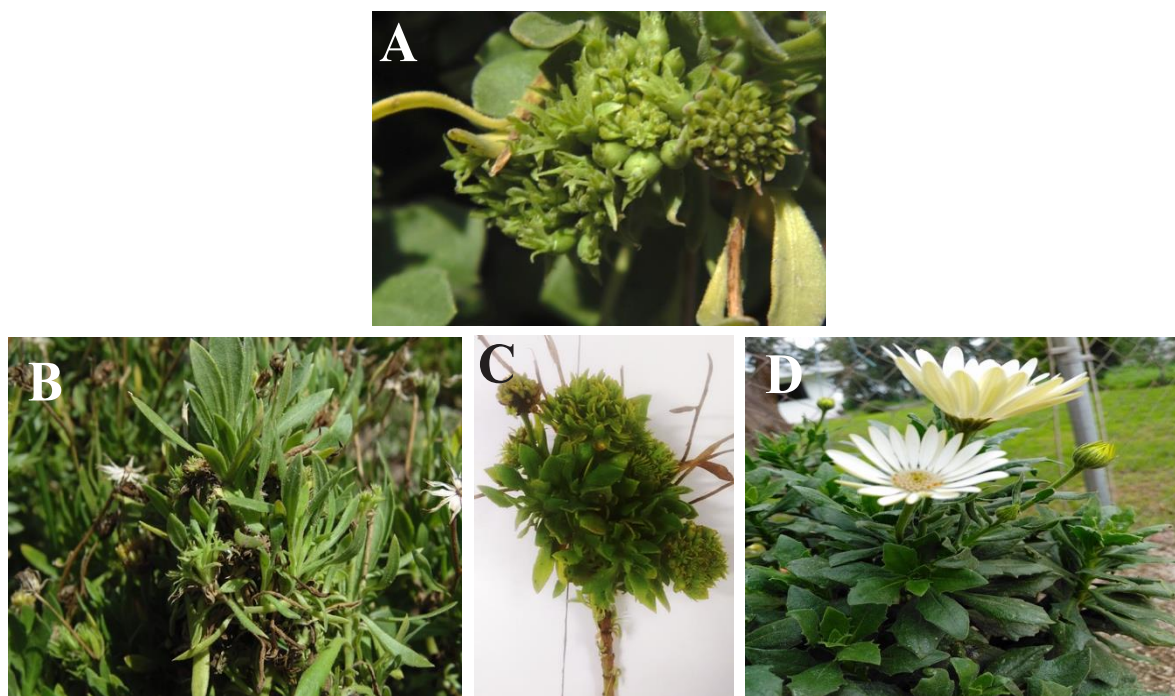


Figura 1. A-C. Plantas de margarita exhibiendo síntomas de filodia y proliferación de brotes, (D) planta asintomática.
Figure 1. A-C. Daisy plants showing symptoms of phyllody and proliferation of sprouts, (D) asymptomatic plants.

realizó con los iniciadores R16F2n / R16R2 (Gundersen y Lee, 1996) que amplifican un fragmento de 1200 pb de la región 16S rADN de los fitoplasmas. Como ADN molde se utilizó el producto amplificado de la primera reacción de PCR diluido en agua estéril libre de nucleasas (1:20) usando las mismas concentraciones y reactivos que en la amplificación directa, con el siguiente programa: desnaturalización a 94 °C por 2 min, seguido de 35 ciclos de 94 °C por 1 min, 58 °C por 2 min, 72 °C por 3 min y una extensión final a 72 °C por 10 min.

Secuenciación y análisis filogenético. El producto obtenido de PCR se purificó y secuenció (Macrogen Inc. Corea) en ambas direcciones. Las secuencias obtenidas se analizaron, depositaron y compararon en la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, 2016)

National Center for Biotechnology Information (NCBI, 2016) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) using the BLAST. With the sequence obtained, we carried out a tool phylogenetic analysis with other species of phytoplasmas (Figure 3).

In all samples with symptoms, we obtained the expected fragment of 1200 pb for phytoplasmas (Figura 2A). The sequences obtained (Access No. MK278895 and MK278896) had a similarity of 99% with *Candidatus* Phytoplasma asteris group 16srI-B obtained from *Vitis vinifera* in Iran (MH638316.1). The analysis of RFLP *in vitro* (Figure 2B) indicated that the phytoplasma of this study belongs to the group of the Aster yellow, now recognized as *Candidatus* Phytoplasma asteris.

The use of restriction enzymes to identify groups of phytoplasmas are still useful, since the electrophoretic profiles generated by each of the

(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) utilizando la herramienta BLAST. Con la secuencia obtenida se realizó un análisis filogenético con otras especies de fitoplasmas (Figura 3).

En todas las muestras con síntomas se obtuvo el fragmento esperado de 1200 pb para fitoplasmas (Figura 2A). Las secuencias obtenidas (No. acceso MK278895 y MK278896) tuvieron 99% de similitud con *Candidatus Phytoplasma asteris* grupo 16srI-B obtenido de *Vitis vinifera* en Irán (MH638316.1). El análisis de RFLP *in vitro* (Figura 2B) indicó que el fitoplasma de este estudio pertenece al grupo del amarillamiento del áster, reconocido ahora como *Candidatus Phytoplasma asteris*.

El uso de enzimas de restricción para identificar grupos de fitoplasmas siguen siendo útiles ya que los perfiles electroforéticos que genera cada una de las enzimas son un indicativo de la variación presente en su genoma por lo que estos patrones se convierten en una huella genética. En la mayoría de las investigaciones, las enzimas que más se utilizan con este propósito son *MseI* (*Tru 91*), *AluI*, *RsaI*, *HhaI*, *HpaII* y *HpaIII* (De Oliveira *et al.*, 2011). Los fitoplasmas del amarillamiento del áster constituyen un grupo cosmopolita que se encuentra en la mayoría de las plantas en condiciones naturales, debido a su plasticidad para adaptarse a muchos hospedantes, por lo que pueden llegar a constituirse eventualmente en un serio problema (Lee *et al.*, 2000). Se conoce que la mayoría de los síntomas que inducen los fitoplasmas son los mismos en diferentes especies y que en un cultivo o en una planta se puede encontrar más de un fitoplasma. Debido a que la sintomatología es la misma, se puede hacer caso omiso del potencial infectivo que puedan tener algunos de ellos y diseminarse a cultivos de interés agronómico y, por lo tanto, causar un problema económico. En México la mayoría de los estudios están enfocados en la detección de

enzymes are an indicator of the variation present in their genome, and therefore these patterns become a genetic footprint. In many investigations, the enzymes most used for this purpose are *MseI* (*Tru 91*), *AluI*, *RsaI*, *HhaI*, *HpaII* and *HpaIII* (De Oliveira *et al.*, 2011). The phytoplasmas of the Aster yellow constitute a cosmopolitan group that is found in most plants in natural conditions, due to its plasticity to adapt to many hosts, and they can therefore eventually become a serious problem (Lee *et al.*, 2000). Most symptoms induced by phytoplasmas are known to be the same in different species, and that a crop or a single plant may contain more than one phytoplasma. Because the symptomatology is the same, one may ignore the infectious potential of some may have and disseminate to crops of agronomical interest, leading to a possible economic problem. In Mexico, most studies are focused on detecting these pathogens, and in a few cases, such as the lethal yellowing of palm, work has been done with genetic breeding and replacements of material in areas seriously affected by the disease. Another disease of economic impact in a field caused by a phytoplasma is the thickening of the cladodes of prickly pear, since it reduces considerably the production of prickly pears in all production areas (Suaste *et al.*, 2012). In recent years, the presence of phytoplasmas has been observed in ornamental plants introduced into Mexico (Rojas *et al.*, 2017), since they showing abundant proliferations, and in some cases, green flowers that consumers find very attractive; this situation may favor the appearance of emerging diseases. On the other hand, the literature indicates that symptoms may appear one week after the inoculation of the phytoplasma; however, this depends on the temperature conditions and the plant species. The severity of the symptoms varies according to the age of the plant, the isolate of phytoplasma and

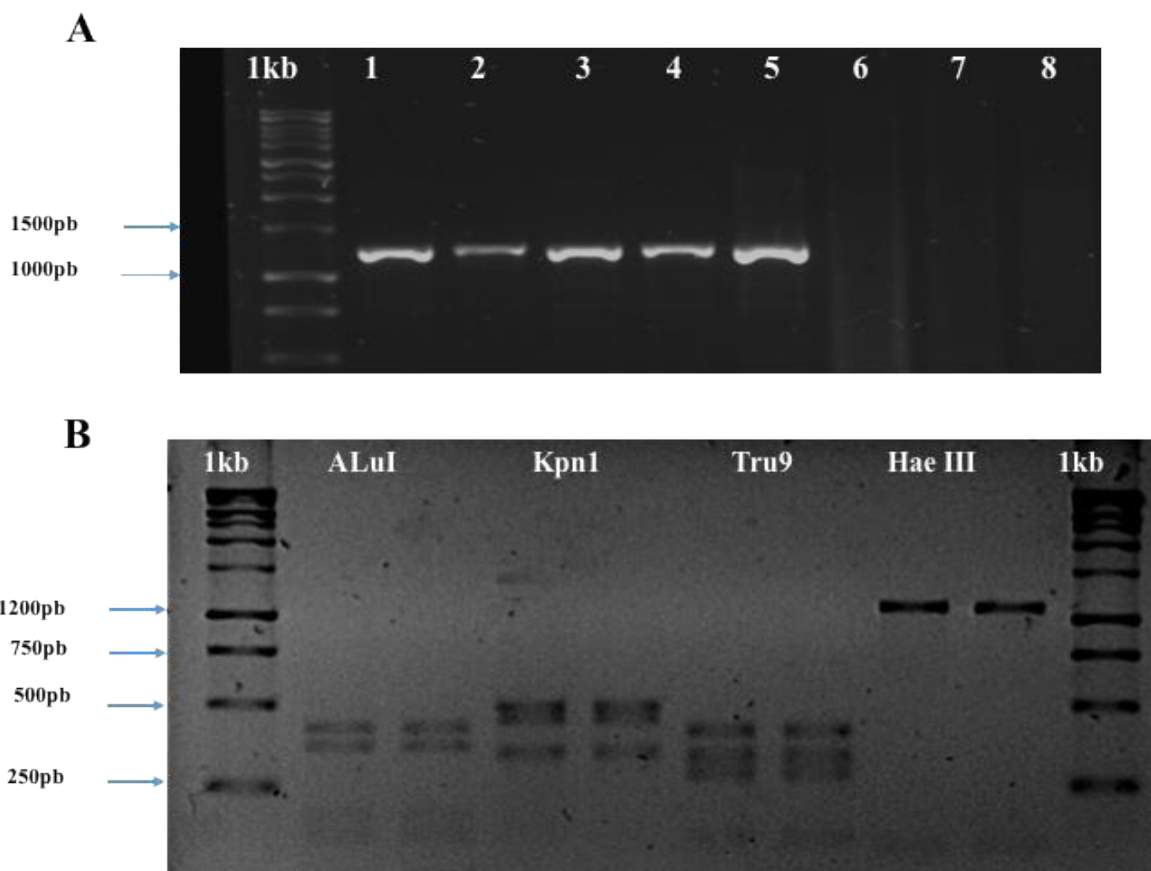


Figura 2. (A) Productos de PCR obtenidos con los iniciadores R16F2n/R16R2. Gel de agarosa al 1%. Carril 1-5, muestras de margarita con síntomas de filodia; Carril 6 y 7, muestras asintomáticas; Carril 8, Control negativo (agua); Carril 1kb, Marcador molecular 1kb (Promega®). (B) Digestión de los productos de PCR anidada con enzimas de restricción. Carril 1 y 10 Marcador 1kb (Promega®), Carril 2 y 3 producto de digestión de la enzima *AluI*; Carril 4 y 5 digestión con la enzima *KpnI*; Carril 6 y 7 producto de la digestión con la enzima *Tru9I*; Carril 8 y 9 productos de digestión con la enzima *Hae III*.

Figure 2. (A) Products of PCR obtained with primers R16F2n/R16R2. Agarose gel at 1%. Lanes 1-5, samples of daisies with symptoms of phyllody; Lanes 6 y 7, asymptomatic samples; Lane 8, Negative control (water); Lane 1kb, molecular marker 1kb (Promega®). (B) Digestion of the PCR products with restriction enzymes. Lanes 1 and 10 marker 1kb (Promega®), Lanes 2 and 3 product of digestion with *AluI*; Lanes 4 and 5 digestion with *KpnI*; Lanes 6 and 7 product of the digestion with *Tru9I*; Lanes 8 and 9 products of the digestion with *Hae III*.

estos patógenos y, en pocos casos como el amarillamiento letal del cocotero, se ha trabajado con mejoramiento genético y reemplazo de material en las zonas seriamente afectadas debido al impacto de la enfermedad. Otra enfermedad de impacto económico en un cultivo ocasionada por un fitoplasma es el engrosamiento del cladodio del nopal al reducir

the time of infection (Weintraub and Bealand 2006). Likewise, the phytoplasma is occasionally detected in symptomatic plants that presented no alteration in its period of development (Rojas *et al.*, 1999). Some phytoplasmas are acquired and transmitted exclusively by one species of insects; however, others are transmitted by different insect

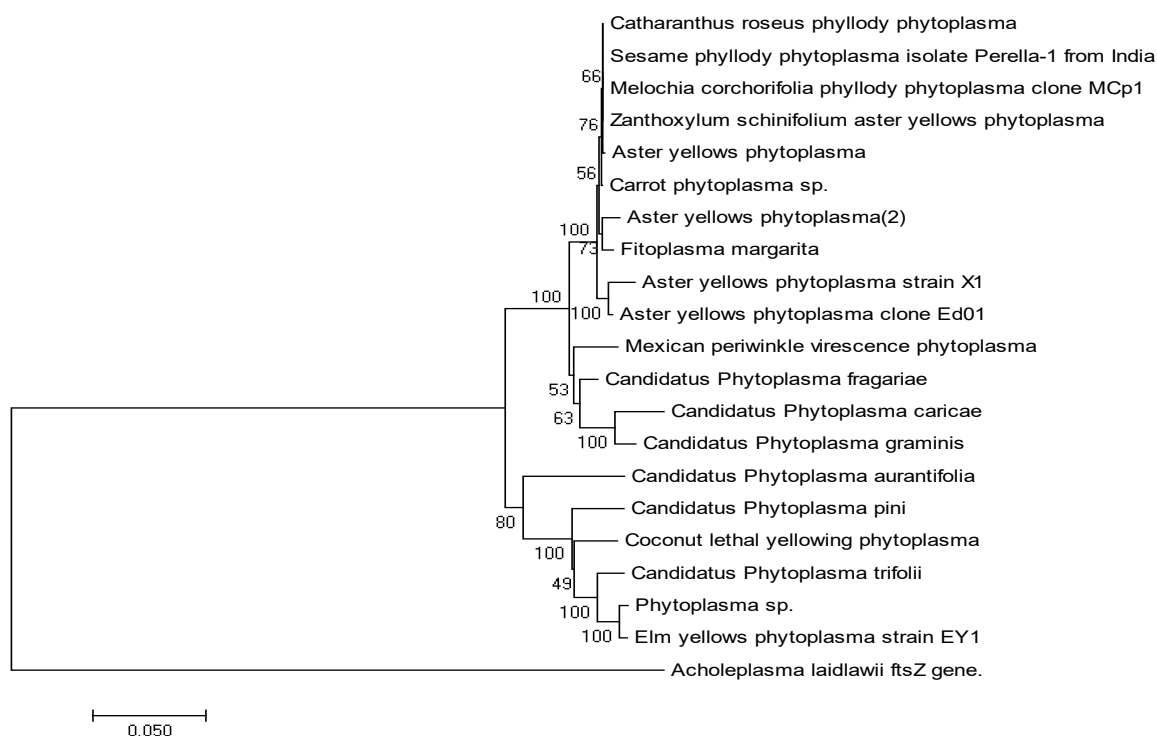


Figura 3. Árbol filogenético basado en el DNA ribosomal 16S de secuencias de fitoplasmas, los cuales están disponible en el NCBI. Se consideró como raíz *Acholeplasma laidlawii* micoplasma que puede cultivarse *in vitro* y que genéticamente no está relacionado con fitoplasmas. El árbol se construyó con p CLUSTAL_X por el método de neighbour-joining con 500 repeticiones.

Figure 3. Phylogenetic tree based on ribosomal DNA 16S of phytoplasma sequences available in the NCBI. *Acholeplasma laidlawii*, a that can be cultivated *in vitro* and that is not genetically related to phytoplasmas data base, was considered as a root. The tree was created using p CLUSTAL_X with the neighbor-joining method with 500 repetitions.

de manera considerable la producción de tuna en todas las zonas productoras (Suaste *et al.*, 2012). En los últimos años se ha observado la presencia de fitoplasmas en plantas de ornato que se introducen a nuestro país (Rojas *et al.*, 2017) debido a que exhiben abundantes proliferaciones y, en algunas ocasiones, flores verdes que resultan muy llamativas para los consumidores; esta situación puede favorecer la aparición de enfermedades emergentes. Por otro lado, la literatura indica que los síntomas pueden aparecer una semana después de la inoculación del fitoplasma; sin embargo, esto depende de las condiciones de temperatura y de la especie

species. From an epidemiological point of view, the transmission of phytoplasmas by insects is particularly important if they are polyphagous, as in the case of cicadellids, which also constitute an important reservoir of these pathogens (Weintraub and Bealand 2006).

Phytoplasmas have a metabolically limited genome with moving elements that contain information to codify different effectors that are transcription factors that modulate diverse responses in the plant (Bai *et al.*, 2006). As a result of this, alterations such as witch's broom are produced, as well as changes in the structure and color of the

vegetal, la severidad de los síntomas varía según la edad de la planta, aislamiento de fitoplasma y el tiempo de infección (Weintraub y Bealand 2006). Asimismo, en ocasiones se detecta al fitoplasma en plantas con síntomas que en su periodo de desarrollo no exhibieron ninguna alteración (Rojas *et al.*, 1999), algunos fitoplasmas son adquiridos y transmitidos exclusivamente por una especie de insectos; sin embargo existen otros que son transmitidos por distintas especies. Desde el punto de vista epidemiológico la transmisión de fitoplasmas por insectos es particularmente importante si éstos son polívoros como es el caso de los cicadélidos quienes constituyen además un importante reservorio de estos patógenos (Weintraub y Bealand 2006).

Los fitoplasmas tienen un genoma metabólicamente limitado con elementos móviles que contienen información para codificar diferentes efectores que son factores de transcripción que modulan diversas respuestas en la planta (Bai *et al.*, 2006). Resultado de lo anterior, se originan alteraciones como la escoba de bruja; así como cambios en la estructura y color de las hojas o la supresión de la respuesta de defensa de la planta a los insectos vectores de estos patógenos (Cettul y Fierrao, 2011). Por último, es conveniente realizar investigación relacionada con los insectos que colonizan esta planta de ornato ya que se encuentra ampliamente distribuida en el país, particularmente aledaña a huertas de durazno, ciruela, nopal, haba, frijol y calabaza entre otros.

Con la detección de *Dimorphotheca sinuata* como un nuevo hospedante de *Candidatus Phytoplasma asteris* se amplía el conocimiento de la gama de hospedante alternos para este grupo de fitoplasmas y lo convierte en una fuente de inóculo potencial para otros cultivos de interés económico hospedantes de este fitoplasma, como lo son la avena donde el subgrupo 16SrI-B induce serios daños a este cultivo como, proliferación anormal

leaves or suppression in the defense response of the plant to vector insects of these pathogens (Cettul and Fierrao, 2011). Finally, it is worth investigating insects that colonize this ornamental plant, since it is widely distributed in Mexico, particularly adjacent to peach, plum, cactus, broadbean, bean and pumpkin crops, among others.

With the detection of *Dimorphotheca sinuata* as a new host of *Candidatus Phytoplasma asteris*, the knowledge on the range of alternate hosts for this group of phytoplasmas broadens, and turns it into a potential source of inoculant for other crops of economic interest that host this phytoplasma, such as oat, where the subgroup 16SrI-B induces serious damage to this crop consisting in an abnormal proliferation and yellowing and sterilization of spikes, delay in growth and the production of sterile seeds (Urbanavičienė *et al.*, 2006). In this ornamental species (*Dimorphotheca sinuata*), one phytoplasma belonging to group 16SrIX, causing phyllody, growth delay and virescence in Italy (Marcone *et al.*, 2001) had been reported.

The symptoms of phyllody and proliferation of daisy (*Dimorphotheca sinuata*) were associated with *Candidatus Phytoplasma asteris*, phylogenetically related to group 16SrI-B. *Dimorphotheca sinuata* is reported, for the first time, as a new host for *Candidatus Phytoplasma asteris*.

~~~~~ End of the English version ~~~~~

y amarillamiento de espigas, estériles, retraso de crecimiento y producción de semillas estériles (Urbanavičienė *et al.*, 2006). En esta especie ornamental (*Dimorphotheca sinuata*), solo se tiene el reporte de un fitoplasma perteneciente al grupo 16SrIX, causando retraso de crecimiento, filodia y virescencia en Italia (Marcone *et al.*, 2001).

Los síntomas de filodia y proliferación de margarita (*Dimorphotheca sinuata*) se asociaron a la infección de *Candidatus Phytoplasma asteris*, relacionado filogenéticamente al grupo 16SrI-B. Se reporta por vez primera a *Dimorphotheca sinuata* como un nuevo hospedante de *Candidatus Phytoplasma asteris*.

## LITERATURA CITADA

- Bai X, Zhang J, Ewing A, Miller SA, Jancso RA, Shevchenko DV, Tsukerman K, Walunas T, Lapidus A and Campbell JW. 2006 Living with genome instability: the adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts. *Journal of Bacteriology* 188:3682-3696. DOI:10.1128/JB.188.10.3682-3696.
- Cettul E and Firrao G. 2011. Development of phytoplasma-induced flower symptoms in *Arabidopsis thaliana*. *Physiology and Molecular Plant Pathology* 76:204-211. DOI:10.1016/j.pmpp.2011.09.001
- De Oliveira AP, Mello A, Eckstein B, Flores D, Fabretti KP and Bedendo IP. 2011. Identification by computer-simulated RFLP of phytoplasmas associated with eggplant giant calyx representative of two subgroups, a lineage of 16SrIII-J and the new subgroup 16SrIII-U. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 61: 1454–1461. DOI: 10.1099/ijs.0.019141-0
- Deng SJ and Hiruki, C. 1991. Genetic relatedness between to non culturable mycoplasma-like organisms revealed by nucleic acid hybridization and polymerase chain reaction. *Phytopathology* 81: 1475-1479. DOI: 10.1094/Phyto-81-1475
- Dellaporta SL, Wood J and Hicks JB. 1983. A plant DNA Miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Report*. 1:19-21. DOI: 10.1007/BF02712670
- Gundersen DE and Lee I-M. 1996. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathology Mediterranean*. 35:114-51. <https://www.jstor.org/stable/42685262>
- Hogenhout SA and Segura-Music, M. 2010. Phytoplasma genomics, from sequencing to comparative and functional genomics-What have we learnt? pág. 19-36. eds P.G. Weintraub and P. Jones *In: Phytoplasmas: Genomes, Plant Hosts and Vectors* <http://ebookcentral.proquest.com/lib/colpos-ebooks/detail.action?docID=476509>
- Kirkpatrick B, Smart C, Gardner S, Gao JL, Ahrens U, Mäurer R, Schneider B, Lorenz, K-H, Seemüller E, Harrison N, Namba S and Daire X. 1994. Phylogenetic relationships of plant pathogenic MLOs established by 16/23S rDNA spacer sequences. *IOM Letters* 3, 228– 9.
- Lee IM, Davis RE and Gundersen-Rindal DE. 2000. Phytoplasma: phytopathogenic mollicutes. *Annual Review of Microbiology* 54:221–255. DOI:org/10.1146/annurev.micro.
- Marcone C, Ragozzino A, Camele I, Rana GL, Seemüller E. 2001. Updating and extending genetic characterization and classification of phytoplasmas from wild and cultivated plants in southern Italy. *Journal of Plant Pathology* 83, 133–138.
- Oshima K, Kakizawa S, Nishigawa H, Jung HY, Wei W, Suzuki S, Arashida R, Nakata D, Miyata S and Ugaki M. 2004. Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of a plant-pathogenic phytoplasma. *Nature Genetics* 36:27-29. DOI: 10.1038/ng1277
- Rojas-Martínez RI, Zavaleta-Mejía E, Trejo LC, and Azpiroz HR. 1999. Some physiological alterations in marigold (*Tagetes erecta* L.) plants infected by phytoplasmas. *Fitopatología*. 34:225--229. [https://www.researchgate.net/profile/Emma\\_Zavaleta-Mejia/publication/295073546\\_Some\\_physiological\\_alterations\\_in\\_marigold\\_Tagetes\\_erecta\\_L\\_plants\\_infected\\_by\\_phytoplasmas/links/56c6d15708ae0d3b1b6179eb/Some-physiological-alterations-in-marigold-Tagetes-erecta-L-plants-infected-by-phytoplasmas.pdf?origin=publication\\_list](https://www.researchgate.net/profile/Emma_Zavaleta-Mejia/publication/295073546_Some_physiological_alterations_in_marigold_Tagetes_erecta_L_plants_infected_by_phytoplasmas/links/56c6d15708ae0d3b1b6179eb/Some-physiological-alterations-in-marigold-Tagetes-erecta-L-plants-infected-by-phytoplasmas.pdf?origin=publication_list)
- Rojas-Martínez RI, Ochoa Martínez D L y Zavaleta Mejía E. 2013. Fitoplasmas y Ca. *Liberibacter* sp. en cultivos agrícolas. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco, Edo de México. 56p. ISBN 978-607-715-138-8.
- Rojas-Martínez RI, Zavaleta-Mejía E e Ing-Ming L. 2009. Identificación de un aislamiento del grupo 16SrIII *Candidatus Phytoplasma pruni* en plantas y semillas de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* l.) en México. *Agrociencia*. 43:851-860.
- 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. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61225129007>
- Sugio A and Hogenhout SA. 2012. The genome biology of phytoplasma: modulator of plant and insects. *Current Opinion in Microbiology*, 15:247–254. DOI:10.1016/j.mib.2012.04.002
- Weisburg WG, Tully JG, Rose DL, Petzel JP, Oyaizu H, Yang D, Mandelco L, Sechrest J, Lawrence TG and VanEtten J. 1989. A phylogenetic analysis of the mycoplasmas: basis for their classification. *Journal of Bacteriology*. 171:6455–67. DOI:10.1128/jb.171.12.6455-6467.1989.
- Weintraub P and Bealand A. 2006. Insect vectors of phytoplasmas. *Annual Review of Entomology* 51: 91-111. DOI:10.1146/annurev.ento.51.110104.151039.
- Urbanavičienė L, Jomantienė R, Valiūnas D, Davis RE. 2007. Molecular identification of 16SrIA, 16SrI-B, 16SrI-C, and 16SrI-L subgroups of phytoplasmas in gramineous plants in Lithuania. *Bulletin of Insectology* 60, 127–128.
- Marcone C, Ragozzino A, Camele I, Rana GL, Seemüller E. 2001. Updating and extending genetic characterization and classification of phytoplasmas from wild and cultivated plants in southern Italy. *Journal of Plant Pathology* 83, 133–138.