

**'Candidatus Phytoplasma trifolii' (16SrVI) EN CHILE MIRASOL
(*Capsicum annuum* L.) CULTIVADO EN ZACATECAS, MÉXICO**

**'Candidatus Phytoplasma trifolii' (16SrVI) IN MIRASOL CHILI PEPPER
(*Capsicum annuum* L.) CULTIVATED IN ZACATECAS, MÉXICO**

**Jorge A. Mauricio-Castillo¹, Silvia Salas-Muñoz², Rodolfo Velásquez-Valle²,
Salvador Ambríz-Granados³ y Luis R. Reveles-Torres^{2*}**

¹Unidad Académica de Agronomía, Universidad Autónoma de Zacatecas. km. 15.5 carr. Zacatecas-Guadalajara. 98170, Cieneguillas, Zacatecas, México. Tel. 01 (492) 925-66-90 Ext. 2701. ²Campo Experimental Zacatecas, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. km. 24.5 carr. Zacatecas-Fresnillo. 98500, Calera de V. R., Zacatecas, México. Tel. 01 (800) 088-22-22 Ext. 82309. ³Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A. C., Camino a la Presa San José # 2055. 78216, San Luis Potosí, S. L. P., México. Tel. 01 (444) 834-20-79.

*Autor de correspondencia (reveles.roberto@inifap.gob.mx)

RESUMEN

Plantas de chile (*Capsicum annuum* L.) para secado tipo Mirasol que mostraban síntomas de yema grande, amarillamiento y enrollamiento foliar, fueron colectadas en parcelas comerciales en el municipio de Calera de Víctor Rosales, Zacatecas, México. Se analizaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) anidada para determinar la presencia de fitoplasmas, con el par de oligonucleótidos universales P1/Tint, seguido del par R16F2n/R16R2, y del análisis de fragmentos del ADNr 16S mediante la obtención de bandas polimórficas a partir de patrones de restricción (RFLP). La presencia de dos patrones de restricción diferentes indicó la existencia de dos nuevas cepas de 'Candidatus Phytoplasma trifolii', grupo 16SrVI. La primera secuencia de fitoplasma (ChZac4F3) correspondió al subgrupo 16SrVI-A; en cambio la segunda secuencia de fitoplasma (ChZac5F1) se clasificó dentro de un nuevo subgrupo (16SrVI-J). Ambas secuencias mostraron una similitud de 99.2 y 99.1 %, respectivamente, al ser comparadas con la cepa de referencia de 'Candidatus Phytoplasma trifolii' (AY390261) al analizarlas con el programa iPhyClassifier. Este es el primer reporte de dos nuevas cepas de 'Candidatus Phytoplasma trifolii' asociadas con la sintomatología de yema grande, amarillamiento y enrollamiento foliar en chile Mirasol en Zacatecas, México.

Palabras clave: 'Candidatus Phytoplasma trifolii', *Capsicum annuum*, diagnóstico molecular, PCR.

SUMMARY

Dry chili pepper Mirasol type plants (*Capsicum annuum* L.) exhibiting foliar yellowing, big bud, and rolled-up margins symptoms were collected from commercial pepper fields in Calera de Víctor Rosales country, Zacatecas, México. They were examined to determine the presence of phytoplasmas by nested polymerase chain reaction (PCR) using the universal primer pair P1/Tint, followed by the primer pair R16F2n/R16R2 and restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of 16S rDNA sequences. The presence of two different RFLP patterns in clones from different samples indicated the presence of two phytoplasma isolates. Each was classified as strains of 'Candidatus Phytoplasma trifolii', that belong to group 16SrVI. The first ChZac4F3 phytoplasma sequence belongs to subgroup 16SrVI-A, while the second ChZac5F1 phytoplasma sequence was classified into a new subgroup (16SrVI-J). ChZac4F3 and ChZac5F1 phytoplasma sequences showed a similarity of 99.2 and 99.1 %, respectively, with the reference strain of 'Candidatus Phytoplasma trifolii' (AY390261), when both were analyzed via the

iPhyClassifier program. This is the first report of two new strains of 'Candidatus Phytoplasma trifolii' associated to foliar yellowing, big bud and rolled-up margins symptoms in Mirasol chili pepper in Zacatecas, México.

Index words: 'Candidatus Phytoplasma trifolii', *Capsicum annuum*, molecular diagnostics, PCR.

INTRODUCCIÓN

El chile (*Capsicum annuum* L.) es un importante cultivo hortícola en México. A nivel mundial México ocupa el segundo lugar en producción y el tercero en área cultivada, con 1,853,610 t y 140,693 ha, respectivamente. En el 2012, la producción nacional de chile para secado fue alrededor de 56,000 t en una área cultivada de 40,623 ha cuyo valor de la producción fue de 185.3 millones de dólares (SIAP, 2012). El estado de Zacatecas es el productor de chile para secado más importante de México, pero su producción es afectada por un amplio rango de enfermedades causadas por hongos, bacterias, nematodos y virus (Velásquez-Valle *et al.*, 2013). En adición, desde hace aproximadamente 4 años en este cultivo se ha presentado una nueva sintomatología que ha causado grandes pérdidas económicas en los cultivos de chile Mirasol presentes en el estado de Zacatecas (Velásquez-Valle *et al.*, 2011). Este nuevo grupo de síntomas han recibido el nombre de amarillamiento del chile, el cual se ha atribuido a infecciones causadas por fitoplasmas.

Los fitoplasmas son procariotes carentes de pared celular y transmitidos por insectos causantes de numerosas enfermedades en una gran cantidad de plantas de interés económico y ambiental a nivel mundial (McCoy *et al.*, 1989; Lee *et al.*, 2000; Seemüller y Schneider, 2004; Hogenhout *et al.*, 2008). Los síntomas asociados con la infección causada por fitoplasmas incluyen decoloración foliar, los pétalos se tornan de color verde (virescencia), conversión de estructuras florales en foliares (yema grande

o brote grande), proliferación de raíces, brotes con aspecto de “escobas de bruja”, enanismo, decaimiento general, y en ocasiones muerte de la planta (Dickinson *et al.*, 2012).

La identificación y clasificación de los fitoplasmas se basaba en la sintomatología, rango de hospederos, imágenes de microscopía electrónica, uso de anticuerpos monoclonales, tinciones y especificidad con el vector, características que son insuficientes para el análisis filogenético entre los diferentes tipos de fitoplasmas (Lee *et al.*, 2000). Actualmente, la clasificación de los fitoplasmas se basa en el análisis molecular de genes conservados, en particular del gen *16S* ribosomal. Los fitoplasmas han sido clasificados en 31 grupos y más de 100 subgrupos, con base en el análisis de los patrones de restricción obtenidos mediante la técnica de RFLP a partir de fragmentos del gen *16S* ribosomal analizados mediante electroforesis en gel de agarosa, tanto *in silico* (simulación computacional) como en fresco (Lee *et al.*, 2000; Wei *et al.*, 2007).

En Canadá se reportó la enfermedad conocida como proliferación del trébol híbrido (*Trifolium sp.*), cuyo agente causal se presumía de origen viral debido al amarillamiento en las plantas afectadas (Chiykowski, 1965). Investigaciones subsecuentes revelaron que la proliferación del trébol era causada por fitoplasmas pertenecientes al grupo *16SrVI* que además afectaban cultivos de tomate (*Lycopersicon esculentum*), papa (*Solanum tuberosum*) y olmo (*Ulmus minor*) en Norte América (Chen y Hiruki, 1975; Deng y Hiruki, 1991; Lee *et al.*, 1991; Shaw *et al.*, 1993; Jacobs *et al.*, 2003;). Actualmente, el grupo *16SrVI* es nombrado taxonómicamente como el grupo ‘*Candidatus Phytoplasma trifolii*’ (Hiruki y Wang, 2004), que recientemente fue asociado con enfermedades presentes en cultivos de chile en España, Líbano, India e Indonesia (Castro y Romero, 2002; Khan y Raj, 2006; Choueiri *et al.*, 2007; Harling *et al.*, 2009).

Varios estudios reportados en Grecia y Estados Unidos han demostrado la relación entre la conversión de estructuras florales en foliares y la infección causada por fitoplasmas en plantas de tomate y chile (Vellios y Liliopoulou, 2007; Randall *et al.*, 2009).

Aunque existe una gran variedad de reportes relacionados con la presencia de otros fitopatógenos causantes de enfermedades en chile en México, como los geminivirus (Torres-Pacheco *et al.*, 1996; Morales y Anderson, 2001; Méndez-Lozano *et al.*, 2003; Velásquez-Valle *et al.*, 2008; Reveles-Torres *et al.*, 2012), los reportes de enfermedades en chile relacionadas con la presencia de fitoplasmas a nivel mundial son escasos. Los primeros métodos de diagnóstico de fitoplasmas en el cultivo de chile en México se realizaron mediante microscopía electrónica (Lebsky y Poghosyan, 2007), posteriormente Santos-Cervantes *et al.* (2008)

reportaron la identidad de un fitoplasma mediante técnicas moleculares.

El objetivo de esta investigación fue identificar a nivel molecular la presencia de nuevas cepas de ‘*Candidatus Phytoplasma trifolii*’ pertenecientes al grupo *16SrVI* en plantas de chile Mirasol cultivado en Zacatecas, México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta de muestras

Un total de 63 muestras de plantas de chile Mirasol para secado de fruto con síntomas de yema grande, amarillamiento y enrollamiento foliar (Figura 1), fueron colectadas de julio a septiembre del 2013 en el municipio de Calera de Víctor Rosales, Zacatecas, México (entre las coordenadas 22° 57' 55.03" N, 102° 41' 04.79" O; 22° 59' 54.75" N, 102° 40' 03.18" O y 22° 59' 07.21" N, 102° 40' 47.35" O). Las muestras se analizaron en el laboratorio de biotecnología del Campo Experimental Zacatecas del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INI-FAP). La extracción del ADN total se hizo a partir de 100 mg de tejido de hoja, mediante una modificación del método descrito por Dellaporta *et al.* (1983), el cual consistió en el uso de nitrógeno líquido y del buffer de extracción “A” (Tris 100 mM-pH 8, NaCl 50 mM-pH 8, EDTA 50 mM-pH 8 y agua destilada estéril). Las pastillas de ADN fueron resuspendidas en 50 µL de agua destilada estéril y después almacenadas a -20 °C.

Detección de fitoplasmas mediante PCR anidado

La detección de fitoplasmas fue mediante la amplificación del gen *16S* ribosomal, con oligonucleótidos universales para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para la PCR directa fueron: P1 5'-AAGAGTTTGATCCTGGCT-CAGGATT-3' y Tint 5'-TCAGGCGTGTGCTCTAAC-CAGC-3' (Smart *et al.*, 1996); y para la PCR anidada los oligonucleótidos usados fueron: R16F2n 5'-GAAACGACT-GCTAAGACTGG-3' y R16R2 5'-TGACGGGCGGTGT-GTACAAACCCCG-3' (Gundersen y Lee, 1996). La mezcla de reacción contenía: 2.5 µL de buffer de PCR (10×), 1.5 µL de MgCl₂ (50 mM), 2.5 µL de dNTPs (20 pM), 0.5 µL de cada oligonucleótido (20 pM), 0.25 µL de Taq polimerasa (5 U/µL), 2.5 µL de extracto de ADN (50 ng/µL) y agua mili Q estéril para un volumen final de 25 µL. Para la PCR anidada se utilizó 1 µL del producto de la PCR directa y se aforó a un volumen final de 25 µL con la mezcla de reacción.

Las reacciones de amplificación se realizaron con un termociclador programable 2720 Thermal Cycler de Applied Biosystems® (USA), con 35 ciclos de desnaturación de 1 min a 94 °C (3 min a 95 °C para el primer



Figura 1. Amarillamiento foliar, yema grande en la parte superior de la planta y enrollamiento foliar en hojas jóvenes de plantas de chile Mirasol.

ciclo), alineamiento de 1 min a 56 °C y una extensión de 2 min a 72 °C (5 min para el último ciclo). Los productos obtenidos fueron reamplificados con 35 ciclos de desnaturación de 1 min a 94 °C (3 min para el primer ciclo), alineamiento de 1 min a 55 °C y una extensión de 2 min a 72 °C (5 min para el último ciclo). Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en un gel de agarosa a 1 %, teñidos con bromuro de etidio y visualizados bajo la luz UV. El ADN de los extractos provenientes de las muestras de chile se usaron como templates para el PCR. El agua mili Q estéril fue usada como control negativo.

Clonación, secuenciación y análisis de RFLP de los productos de PCR

Los productos amplificados de aproximadamente 1.25 kb fueron ligados en el vector pGEM-T Easy (Promega, Madison, WI, USA), conforme a las recomendaciones del proveedor. La transformación del fragmento amplificado se llevó a cabo mediante el método de choque térmico en células competentes de calcio Top-10 de *Escherichia coli*. Las clonas positivas se evaluaron al digerirlas con la enzima de restricción *EcoRI*, con el fin de liberar el fragmento de 1.25 kb que corresponde al gen *16S* ribosomal. Posteriormente, las clonas positivas fueron sometidas a un análisis de RFLP con las enzimas de restricción *HinfI* y *EcoRI* (New England BioLabs™), para identificar bandas polimórficas que indicaran si se trataba de una infección simple o mixta. Los productos digeridos fueron visualizados por electroforesis de gel de agarosa a 2 %. Las clonas seleccionadas fueron

secuenciadas en el Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (LANBAMA) en San Luis Potosí, México.

Análisis filogenético

El árbol filogenético se realizó con dos secuencias del gen *16S* ribosomal pertenecientes a los fitoplasmas *ChZac4F3* y *ChZac5F1*, aislados de plantas enfermas de chile Mirasol. Tales secuencias fueron comparadas con 31 secuencias de fitoplasmas presentes en la base de datos del GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y como grupo externo se utilizó la secuencia de *Acholeplasma brassicae* (número de acceso GenBank AY538163). El programa computacional utilizado fue el módulo Clustal V a través del método “neighbor-joining” dentro del Software DNASTAR Lasergene® (<http://www.dnastar.com/t-dnastar-lasergene-espanol.aspx>). El “bootstrapping” (método de parsimonia y máxima verosimilitud) se llevó a cabo 1000 veces para la estimación de la estabilidad y el apoyo a las ramas. El análisis de las secuencias de nucleótidos se realizó por comparación de las secuencias disponibles en la base de datos del NCBI, mediante la aplicación BLASTn en línea. Para el análisis filogenético se utilizó el método de Clustal V del MegAlign, otro módulo del DNASTAR Lasergene®.

Análisis virtual de los RFLP

Se realizó el análisis de los patrones de restricción obtenidos mediante RFLP de las secuencias *ChZac4F3* y *ChZac5F1*, con el programa de análisis virtual de la página iPhyClassifier (<http://plantpathology.ba.ars.usda.gov/cgi-bin/resource/iphyclassifier.cgi>), citado por Zhao *et al.* (2009). Cada fragmento de ADN fue digerido *in silico* con 17 enzimas de restricción utilizadas para el análisis de los RFLP del gen *16S* ribosomal (Lee *et al.*, 1998). Las enzimas usadas fueron *AluI*, *BamHI*, *BfaI*, *BstUI* (*ThaI*), *DraI*, *EcoRI*, *HaeIII*, *HhaI*, *HinfI*, *HpaI*, *HpaII*, *KpnI*, *Sau3AI* (*MboI*), *MseI*, *RsaI*, *SspI* y *TaqI*. Después del análisis de la digestión con las enzimas de restricción, la imagen virtual del gel de electroforesis a 3 % fue capturado en un archivo PDF, lo que permitió comparar cada grupo y subgrupo de *16S*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Detección de fitoplasmas presentes en plantas de chile Mirasol

En 22 de las 63 muestras analizadas se amplificaron fragmentos asociados con fitoplasmas mediante la técnica de PCR anidado con las combinaciones oligonucleótidos universales P1/Tint y R16F2n/R16R2. Así se confirmó la presencia de una banda de 1.25 kb tanto en los extractos

analizados como en el control positivo (Figura 2). No se observó amplificación en el control negativo (agua estéril). Las clonas obtenidas contenían el fragmento de ADN esperado (1.25 kb) y se confirmó la presencia de ADN de fitoplasma en las secuencias del gen *16S* ribosomal, mediante el programa computacional BLASTn arriba mencionado.

Los reportes de fitoplasmas que afectan al cultivo de chile en Australia, Cuba, India, Indonesia, Líbano, México y España (Castro y Romero, 2002; Tran-Nguyen *et al.*, 2003; Khan y Raj, 2006; Arocha *et al.*, 2007; Choueiri *et al.*, 2007; Lebsky y Poghosyan, 2007; Santos-Cervantes *et al.*, 2008; Harling *et al.*, 2009;), se han caracterizado por la presencia de alguno de los siguientes síntomas: peciolos y entrenudos pequeños, amarillamiento, brotes grandes, hojas pequeñas, proliferación de brotes (“escoba de bruja”) y enanismo.

La sintomatología relacionada con la infección causada por fitoplasmas en las plantas de chile Mirasol analizadas fueron: amarillamiento foliar, yemas grandes principalmente en la parte superior de la planta, y enrollamiento foliar en las hojas más jóvenes; estos síntomas son diferentes a los reportados por Santos-Cervantes *et al.* (2008) en donde

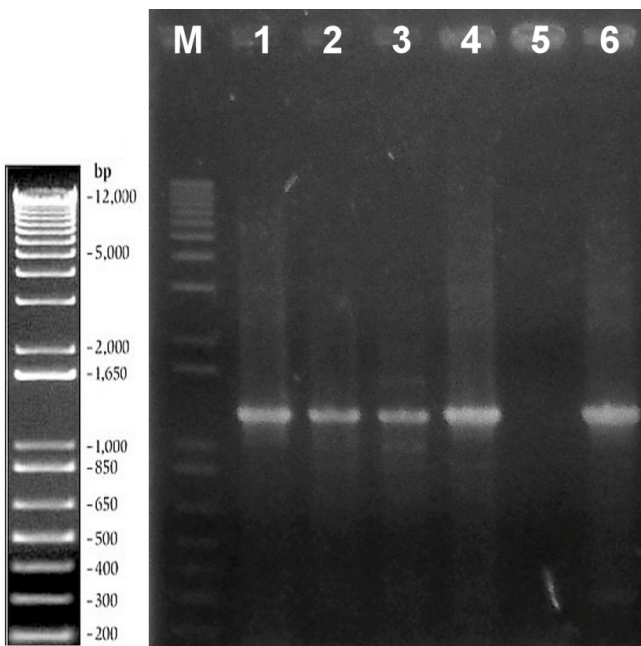


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa a 1 % que muestra los productos del PCR anidado, obtenidos a partir de extractos provenientes de plantas de chile Mirasol mediante el uso de los pares de oligonucleótidos P1/Tint y R16F2n/R16R2. Carril M, marcador de peso molecular de 1 kb plus DNA (Invitrogen Life Technologies); los carriles 1, 2, 3 y 4 corresponden a muestras de chile Mirasol; carril 5, control negativo (agua mili Q estéril); y carril 6, control positivo.

plantas de chile colectadas en los estados de Guanajuato y Sinaloa, México, las cuales mostraron síntomas asociados con ‘*Ca. Phytoplasma asteris*’, como proliferación de brotes y hojas pequeñas.

Análisis de secuencias por RFLP *in silico*

Las clonas obtenidas fueron digeridas con la enzima de restricción *EcoRI* para confirmar que contenían el fragmento de 1.25 kb de nuestro interés. Posteriormente, diez clonas positivas obtenidas a partir de cada uno de los extractos, fueron seleccionadas y analizadas por RFLP con las enzimas de restricción *EcoRI* y *HinfI*. Las clonas provenientes de los mismos extractos mostraron un patrón de restricción idéntico. Sin embargo, se observó la presencia de bandas polimórficas cuando se compararon con los patrones de restricción presentes en clonas obtenidas de otros extractos, lo cual indicó la presencia de al menos dos fitoplasmas que infectan de forma individual a plantas de chile Mirasol y cuya sintomatología en campo es la misma. Posteriormente, las clonas ChZac4F3 y ChZac5F1 fueron seleccionadas para representar cada uno de los patrones de restricción obtenidos, éstos fueron secuenciados y la presencia del gen *16S* ribosomal correspondiente a fitoplasmas fue confirmada mediante análisis con la aplicación BLASTn del NCBI.

Las secuencias ChZac4F3 (KM095133) y ChZac5F1 (KM095132) obtenidas en este trabajo fueron comparadas con las contenidas en la base de datos de iPhyClassifier (Zhao *et al.*, 2013); la máxima identidad a nivel de secuencia fue obtenida con la cepa de referencia para ‘*Candidatus Phytoplasma trifolii*’ (AY390261) con 99.2 y 99.1 % de similitud, respectivamente.

La clasificación de los fitoplasmas aquí aislados a nivel de grupo y subgrupo se realizó mediante el análisis de las secuencias ChZac4F3 y ChZac5F1 por RFLP y geles virtuales obtenidos con iPhyClassifier (Zhao *et al.*, 2013). El patrón de restricción virtual mostró una alta similitud con los miembros del grupo 16SrVI, subgrupo A (AY390261), con un coeficiente de similitud de 0.98 y 0.97, respectivamente (Figura 3A).

Sin embargo, la secuencia del fitoplasma ChZac5F1 podría ser considerada como miembro de un nuevo subgrupo debido a que el patrón de restricción obtenido con la enzima *HinfI* es único con respecto al observado en los demás miembros del grupo VI (Figura 3B). Por lo tanto, ChZac5F1 puede representar un nuevo subgrupo dentro del grupo 16SrVI (16SrVI-J), según los criterios establecidos actualmente (Lee *et al.*, 1998). Con la finalidad de descartar la posibilidad de que la secuencia de ChZac5F1 fuera falsa, se obtuvo la secuencia de tres clonas provenientes de

diferentes extractos que compartían el mismo patrón de restricción que ChZac5F1; las secuencias obtenidas fueron idénticas.

Los primeros reportes a nivel molecular sobre la presencia de ‘*Ca. Phytoplasma trifolii*’ que afectan cultivos de chile provienen de España y Líbano (Castro y Romero, 2002; Choueiri *et al.*, 2007), y posteriormente de los estados de Arizona y Nuevo México en Estados Unidos (Randall *et al.*, 2009). Lo anterior predecía que la presencia de ‘*Ca. Phytoplasma trifolii*’ en el chile Mirasol de Zacatecas era de esperarse, ya que ambas zonas geográficas se encuentran dentro de la franja del desierto Chihuahuense en donde la presencia de *Circulifer tenellus* Baker, reportado como insecto vector de fitoplasmas pertenecientes al grupo 16SrVI (Munyanza *et al.*, 2007) es muy común.

La sintomatología de ‘*Ca. Phytoplasma trifolii*’ aislados

en España causan yema grande, en Líbano enanismo, en Nuevo México enanismo y amarillamiento foliar, y en Arizona solo yema grande. Algunos de estos síntomas son similares a los observados en este trabajo: yema grande y amarillamiento foliar. Además se observó la presencia de enrollamiento foliar en las hojas jóvenes, pero las plantas tenían un tamaño normal e inclusive algunos ejemplares mostraban un tamaño un poco más alto de lo normal. Por ello es necesario establecer metodologías que permitan dilucidar el papel de factores como: tipo de fitoplasma, ambiente, etapa de infección y genotipo de la planta de chile afectada, en la presentación y severidad de los síntomas.

El primer reporte a nivel molecular sobre la presencia de un fitoplasma afectando cultivos de hortalizas (incluyendo chile) en México fue el de ‘*Ca. Phytoplasma asteris*’ (Santos-Cervantes *et al.*, 2008); un fitoplasma previamente descrito en Cuba e India (Khan y Raj, 2006; Arocha *et al.*,

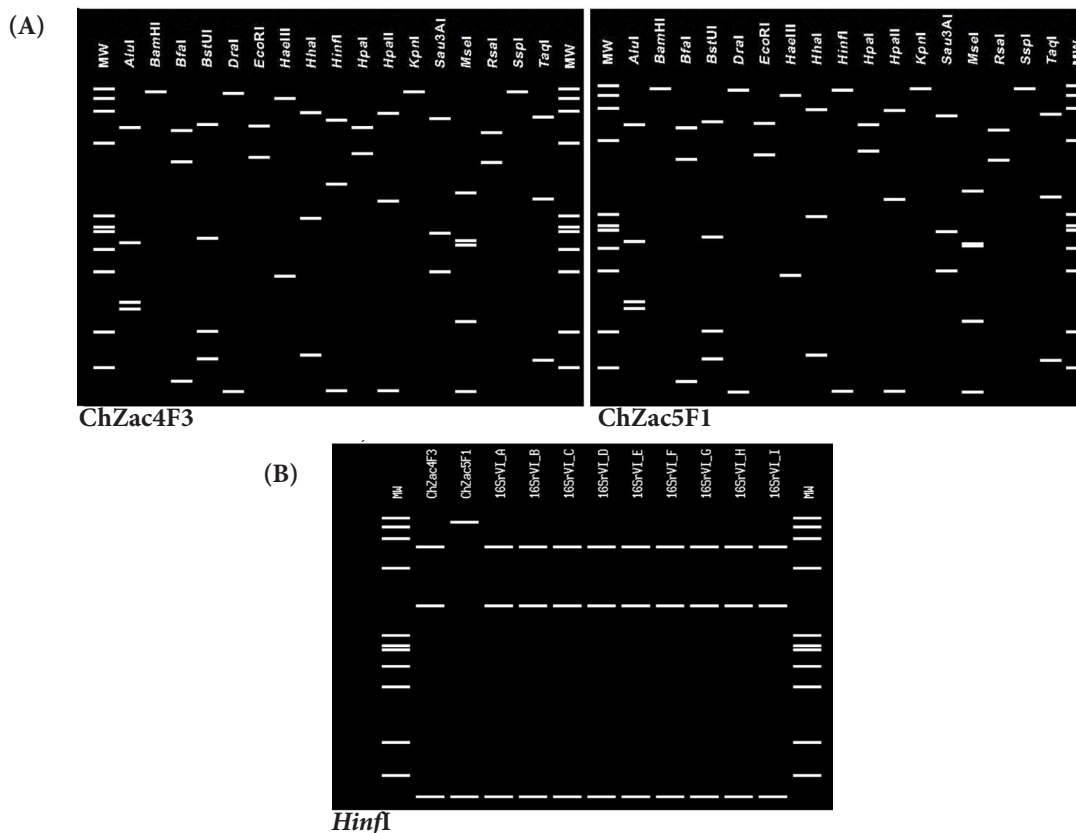


Figura 3. Patrones de restricción virtuales obtenidos a partir del análisis de las secuencias obtenidas con los oligonucleótidos universales R16F2n/R16R2, mediante el programa computacional iPhicClassifier basado en la técnica de RFLP. (A) Imágenes de los patrones de restricción de las secuencias ChZac4F3 y ChZac5F1, 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*. (B) Gel virtual del patrón de restricción de las secuencias ChZac4F3, ChZac5F1 y nueve cepas de fitoplasmas que representan a los diferentes subgrupos (A-I) del grupo ‘*Ca. Phytoplasma trifolii*’ (16SrVI), mediante el uso de enzima de restricción *HinfI*. MW = Marcador de peso molecular obtenido de la digestión del ADN ΦX174 digerido con la enzima *HaeIII*.

2007). Entonces, el presente reporte aporta nueva información sobre las características genotípicas e infectivas de fitoplasmas presentes en México.

Análisis filogenético de los ‘*Ca. Phytoplasma trifolii*’ aislados de plantas de Chile Mirasol

Mediante el algoritmo Clustal V del programa computacional megAlign (DNASTAR I, 1998) se construyó un árbol filogenético basado en las secuencias de los fitoplasmas ChZac4F3 ‘*Ca. Phytoplasma trifolii*’ 16SrVI-A (KM095133) y ChZac5F1 ‘*Ca. Phytoplasma trifolii*’ 16SrVI-J (KM095132), junto con otras 31 secuencias que representan distintos grupos de fitoplasmas. Además, la secuencia de *Acholeplasma brassicae* (AY538163) fue empleada como un grupo de control externo (Figura 4).

Los resultados generados del árbol filogenético concuerdan con los obtenidos en el análisis de las secuencias de los fitoplasmas ChZac4F3 y ChZac5F1 mediante RFLP *in silico*, y confirmaron que ambos son nuevos miembros del grupo 16SrVI, cuyo pariente más cercano es *Portulaca little leaf phytoplasma* 16SrVI (EF651786). Además dichas secuencias dan origen a dos nuevas ramas, lo que indica que se pueden constituir como un nuevo subgrupo dentro del clado 16SrVI.

Debido a que existen otros fitopatógenos como los espiroplasmas que son capaces de provocar patologías similares a las causadas por fitoplasmas (Saied *et al.*, 2014), es importante establecer métodos de fitodiagnóstico que combinen técnicas tradicionales como la evaluación de síntomas y el rango de hospederos con nuevas técnicas moleculares que permitan obtener secuencias de ADN correspondientes a los fitoplasmas que participan como agentes causales de alguna sintomatología en especial; todo con la finalidad de obtener una identificación confiable a nivel taxonómico.

La detección e identificación del agente causal de las enfermedades asociadas con la presencia de fitoplasmas en el cultivo del Chile Mirasol, facilitan el estudio de la epidemiología de la enfermedad y amplía el conocimiento sobre la diversidad genética de los fitoplasmas presentes en México. Este trabajo constituye el primer reporte a nivel molecular de dos nuevas cepas de fitoplasmas pertenecientes al grupo del ‘*Ca. Phytoplasma trifolii*’ (16SrVI) que afectan a plantas de Chile Mirasol en el estado de Zacatecas, México.

CONCLUSIONES

Se aislaron e identificaron a nivel molecular las secuencias de dos nuevas cepas de ‘*Candidatus Phytoplasma trifolii*’ asociadas con la presencia de una sintomatología caracte-

terizada por: yema grande, amarillamiento y enrollamiento foliar en cultivos de Chile Mirasol en el estado de Zacatecas, México. Aunque filogenéticamente ambas secuencias pertenecen al grupo 16SrVI, a nivel de subgrupo la primera secuencia identificada, ChZac4F3, corresponde al subgrupo 16SrVI-A, mientras que la segunda, ChZac5F1, se propone como el primer miembro de un nuevo subgrupo denominado 16SrVI-J. Este es el primer reporte de ‘*Candidatus Phytoplasma trifolii*’ que afecta a cultivos de interés económico en México.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue posible gracias al apoyo económico de los proyectos: el institucional: “Susceptibilidad del germoplasma de Chile al amarillamiento, etiología y diversidad genética de los agentes causales”; el proyecto sectorial SAGARPA-CONACYT de Chile: “Mejoramiento integral de la productividad en el cultivo de Chile en México para aumentar la competitividad, mediante el incremento del rendimiento y calidad”; y el programa de “Cátedras para jóvenes investigadores del CONACYT 2015 número de cátedra 4793”.

BIBLIOGRAFÍA

- Arocha Y., O. Antesana, E. Montellano, P. Franco, G. Plata and P. Jones (2007) ‘*Candidatus Phytoplasma lycopersici*’, a phytoplasma associated with ‘hoja de perejil’ disease in Bolivia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57:1704-1710.
- Castro S. and J. Romero (2002) The association of clover proliferation phytoplasma with stolbur disease of pepper in Spain. *Journal of Phytopathology* 150:25-29.
- Chen M. H. and C. Hiruki (1975) Electron microscopy of mycoplasma-like bodies associated with clover proliferation disease. *Proceedings American Phytopathological Society* 2:52.
- Chiykowski L. (1965) A yellows-type virus of alsike clover in Alberta. *Canadian Journal of Botany* 43:527-536.
- Choueiri E., P. Salar, F. Jreijiri, S. El Zammar, R. Massaad, H. Abdunour, J. M. Bové, J. L. Danet and X. Foissac (2007) Occurrence and distribution of ‘*Candidatus Phytoplasma trifolii*’ associated with diseases of solanaceous crops in Lebanon. *European Journal of Plant Pathology* 118:411-416.
- Dellaporta S. L., J. Wood and J. B. Hicks (1983) A plant DNA miniprep: version II. *Plant Molecular Biology Reporter* 1:19-21.
- Deng S. and C. Hiruki (1991) Amplification of 16S rRNA genes from culturable and nonculturable mollicutes. *Journal of Microbiological Methods* 14:53-61.
- Dickinson M., M. Tuffen and J. Hodgetts (2012) The phytoplasmas: An introduction. In: *Phytoplasma: Methods and Protocols*. M. Dickinson and J. Hodgetts (eds.). Humana Press. Pp:1-14.
- DNASTAR I (1998) MegAlign3. 18th ed. Madison, WI, USA: DNASTAR.
- Gundersen D. and I. Lee (1996) Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathologia Mediterranea* 35:144-151.
- Harling R., Y. Arocha, V. Harju, C. Tobing, E. Boa, P. Kelly and R. Reeder (2009) First report of 16SrII ‘*Candidatus Phytoplasma aurantifolia*’ infecting chilli and tamarillo in Indonesia. *Plant Pathology* 58:791-791.
- Hiruki C. and K. Wang (2004) Clover proliferation phytoplasma: ‘*Candidatus Phytoplasma trifolii*’. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54:1349-1353.
- Hogenhout S. A., K. Oshima, E. D. Ammar, S. Kakizawa and S. Namba

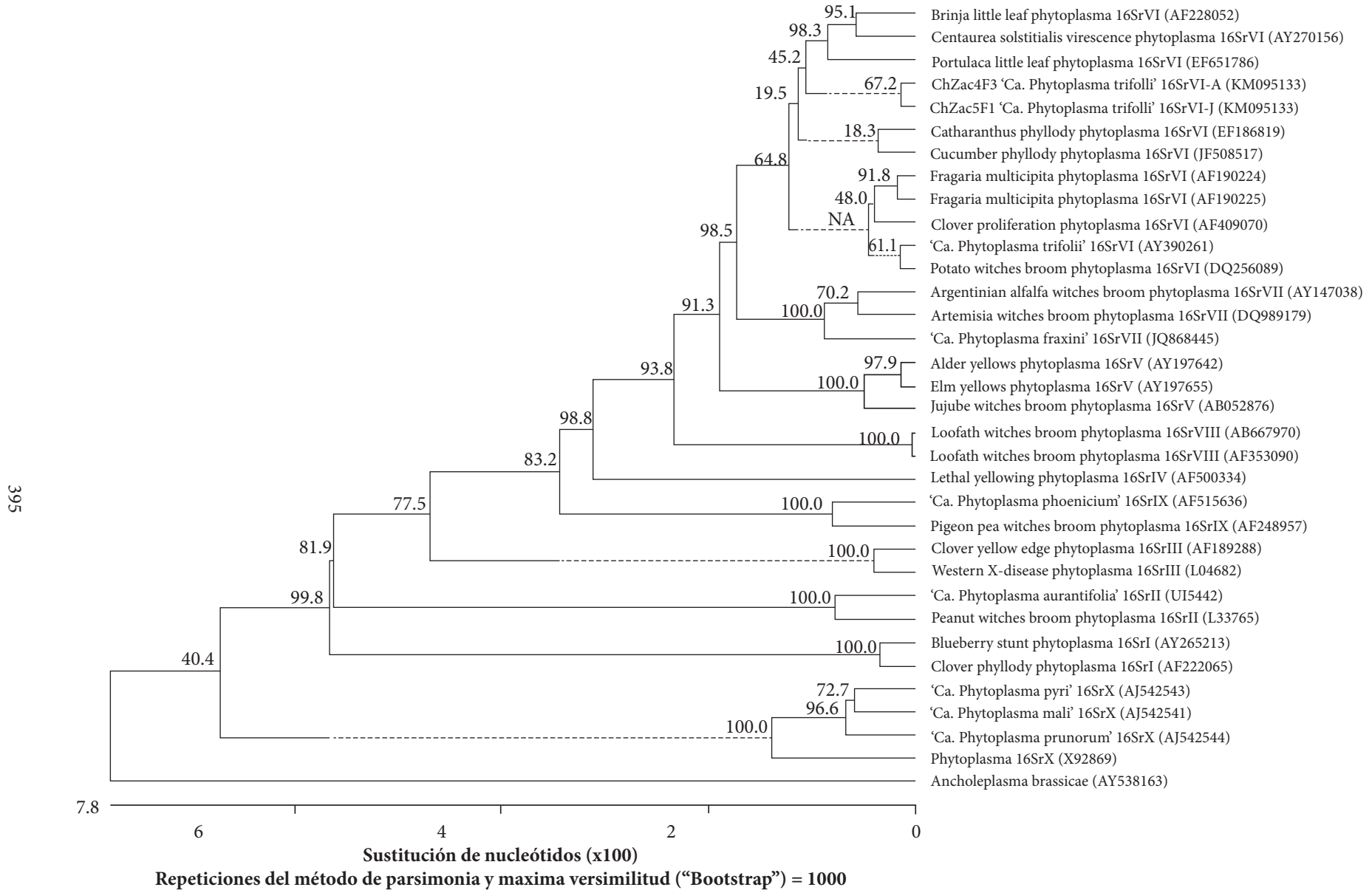


Figura 4. Árbol filogenético que muestra la similitud entre las secuencias ChZac4F3 y ChZac5F1 aisladas de Chile Mirasol, y las de 31 cepas de 'Candidatus Phytoplasma' pertenecientes a los grupos I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX y X; obtenido mediante el algoritmo Clustal V del programa MegAlign (DNASTAR). *Acholeplasma brassicae* fue usado como grupo de control externo. El número de acceso en el GenBank (NCBI) para cada secuencia se muestra en paréntesis.

- (2008) Phytoplasmas: bacteria that manipulate plants and insects. *Molecular Plant Pathology* 9:403-423.
- Jacobs K., I. M. Lee, H. Griffiths, F. Miller Jr. and K. Bottner (2003) A new member of the clover proliferation phytoplasma group (16SrVI) associated with elm yellows in Illinois. *Plant Disease* 87:241-246.
- Khan M. and S. Raj (2006) First report of molecular detection of an Aster yellows phytoplasma ('*Candidatus* Phytoplasma asteris') isolate infecting chilli (*Capsicum annuum*) in India. *Plant Pathology* 55:822-822.
- Lebsky V. and A. Poghosyan (2007) Phytoplasma associated diseases in tomato and pepper in the state of BCS, Mexico: a brief overview. *Bulletin of Insectology* 60:131.
- Lee I. M., D. E. Gundersen-Rindal, R. E. Davis and I. M. Bartoszyk (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., R. E. Davis and D. E. Gundersen-Rindal (2000) Phytoplasma: Phytopathogenic Mollicutes. *Annual Reviews in Microbiology* 54:221-255.
- Lee M., R. E. Davis and C. Hiruki (1991) Genetic interrelatedness among clover proliferation mycoplasma-like organisms (MLOs) and other MLOs investigated by nucleic acid hybridization and restriction fragment length polymorphism analyses. *Applied and Environmental Microbiology* 57:3565-3569.
- McCoy R., A. Caudwell, C. Chang, T. A. Chen, L. N. Chiykowski, M. T. Cousin, J. L. Dale, G. T. N. De Leeuw and D. A. Golino (1989) Plant Diseases Associated with Mycoplasma-Like Organisms. R. F. Whitcomb and J. G. Tully (eds.). New York. Academic Press. pp:545-560.
- Méndez-Lozano J., I. Torres-Pacheco, C. M. Fauquet and R. F. Rivera-Bustamante (2003) Interactions between geminiviruses in a naturally occurring mixture. *Virology* 93:270-277.
- Morales F. J. and P. K. Anderson (2001) The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America. *Archives of Virology* 146: 415-441.
- Munyanza J. E., J. M. Crosslin and I. M. Lee (2007) Phytoplasma diseases and insect vectors in potatoes of the Pacific northwest of the United States. *Bulletin of Insectology* 60:181-182.
- Randall J. J., P. W. Bosland and S. F. Hanson (2009) Brote grande, a new phytoplasma-associated disease of Chile peppers. *Plant Disease* 93:968-969.
- Reveles-Torres L. R., R. Velásquez-Valle, J. A. Mauricio-Castillo y S. Salas-Muñoz (2012) Detección de infecciones mixtas causadas por begomovirus y curtovirus en plantas de Chile para secado en San Luis Potosí, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 30:155-160.
- Saied S. M., E. M. EL-Abagy and S. A. Mokbel (2014) Studies of *Spiroplasma citri* on chili pepper plant in Egypt. *Middle East Journal* 3:968-972.
- Santos-Cervantes M. E., J. A. Chávez-Medina, J. Méndez-Lozano and N. E. Leyva-López (2008) Detection and molecular characterization of two little leaf phytoplasma strains associated with pepper and tomato diseases in Guanajuato and Sinaloa, Mexico. *Plant Disease* 92:1007-1011.
- Seemüller E. and B. Schneider (2004) '*Candidatus* Phytoplasma mali', '*Candidatus* Phytoplasma pyri' and '*Candidatus* Phytoplasma prunorum', the causal agents of apple proliferation, pear decline and European stone fruit yellows, respectively. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54:1217-1226.
- Shaw M., B. Kirkpatrick and D. Golino (1993) The beet leafhopper-transmitted virescence agent causes tomato big bud disease in California. *Plant Disease* 77:290-295.
- SIAP, Sistema de Información Agropecuaria y Pesquera (2012) Producción Agropecuaria y Pesquera. <http://www.siap.gob.mx/agricultura-produccion-anual/> (Nov 2014).
- Smart C. D., B. Schneider, C. L. Blomquist, L. J. Guerra, N. A. Harrison, U. Ahrens, K. H. Lorenz, E. Seemüller and B. C. Kirkpatrick (1996) Phytoplasma-Specific PCR primers based on sequences of the 16S-23S rRNA spacer region. *Applied and Environmental Microbiology* 62:2988-2993.
- Torres-Pacheco I., J. A. Garzón-Tiznado, J. K. Brown, A. Becerra-Flora and R. F. Rivera-Bustamante (1996) Detection and distribution of geminiviruses in Mexico and the southern United States. *Phytopathology* 86:1186-1192.
- Tran-Nguyen L. T., D. Persley and K. Gibb (2003) First report of phytoplasma disease in capsicum, celery and chicory in Queensland, Australia. *Australasian Plant Pathology* 32:559-560.
- Velásquez-Valle R., J. Mena-Covarrubias y L. R. Reveles-Torres (2011) Amarillamientos del Chile para Secado en el Norte-Centro de México. Folleto técnico no. 35. Ed. Campo Experimental Zacatecas, CIRNOC-INIFAP. Calera de V. R., Zacatecas, México. 40 p.
- Velásquez-Valle R., L. R. Reveles-Torres y M. Reveles-Hernández (2013) Manejo de las Principales Enfermedades del Chile para Secado en el Norte Centro de México. Folleto Técnico Núm 50. Campo Experimental Zacatecas. CIRNOC-INIFAP. 57 p.
- Velásquez-Valle R., M. M. Aguilar-Medina and R. Creamer (2008) First report of Beet mild curly top virus infecting Chile pepper in north central, Mexico. *Plant Disease* 92:650.
- Vellios E. and F. Liliopoulou (2007) Detection and characterization of phytoplasmas infecting tomato plants in Greece. *Bulletin of Insectology* 60:157-158.
- Wei W., I. Lee, R. E. Davis, X. Suo and Y. Zhao (2007) Virtual RFLP analysis of 16S rDNA sequences identifies new subgroups in the clover proliferation phytoplasma group. *Bulletin of Insectology* 60:349.
- Zhao Y., W. Wei, I. M. Lee, J. Shao, X. Suo and R. E. Davis (2013) The iPhyClassifier, an interactive online tool for phytoplasma classification and taxonomic assignment. *Methods in Molecular Biology* 938:329-338.
- Zhao Y., W. Wei, I. M. Lee, J. Shao, X. Suo and R. E. Davis (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* 59:2582-93.