

ETIOLOGÍA DEL ENGROSAMIENTO DEL CLADODIO DE NOPAL TUNERO (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.) EN MÉXICO

ETIOLOGY OF CLADODE THICKENING OF PRICKLY PEAR CACTUS (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.) IN MEXICO

Fernando Martínez-Salgado¹, Jesús Pérez-Moreno², Daniel L. Ochoa-Martínez¹,
Reyna I. Rojas-Martínez^{1*}, Gregorio Arellano-Ostoa³

¹Fitosanidad-Fitopatología, ²Edafología, ³Recursos Genéticos y Productividad-Fruticultura.
Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados. Montecillo 56230 México. (rojas@colpos.
mx)

RESUMEN

México ocupa el primer lugar en producción de tuna en el mundo y una de las principales zonas productoras del país está en el oriente del estado de México. El engrosamiento del cladodio es una de las enfermedades más importantes en esta región y afecta la producción de tuna. En México, las investigaciones para determinar la causa de la enfermedad han demostrado la presencia de un fitoplasma asociado a ella; sin embargo, la etiología definitiva se desconoce. El objetivo de esta investigación fue transmitir por injerto el fitoplasma asociado al engrosamiento del cladodio en 20 plantas sanas de nopal obtenidas por cultivo *in vitro*, y la hipótesis fue que éstas mostrarán síntomas de engrosamiento debido al fitoplasma. Todas las plantas injertadas mostraron amarillamiento, reducción de crecimiento y deformación de cladodios jóvenes. La presencia del fitoplasma en las plantas injertadas se corroboró mediante PCR anidada con iniciadores universales que amplifican un fragmento de aproximadamente 1200 bp. La etiología de engrosamiento de cladodios de nopal tunero se debe a *Candidatus* fitoplasma.

Palabras clave: fitoplasma, PCR anidada, planta macho del nopal (*Opuntia ficus indica*).

INTRODUCCIÓN

El nopal (*Opuntia ficus-indica*) es una planta nativa de las regiones templadas semiáridas de México. Su distribución es amplia desde Canadá hasta Argentina y se ha extendido a países africanos, europeos y asiáticos. La especie se cultiva

ABSTRACT

Mexico ranks first in prickly pear production in the world and one of the main producing areas of the country is located at the eastern of the state of Mexico. Cladode thickening is one of the most important diseases in this region and reduces prickly pear production. In Mexico, research to determine the cause of this disease has shown the presence of an associated phytoplasma; however, its ultimate etiology remains unknown. The objective of this research was to transmit by grafting, in 20 healthy *in vitro* cultured prickly pear cactus plants, phytoplasma associated to cladode thickening. The hypothesis was that these plants would show symptoms of thickening due to the associated phytoplasma. All grafted plants showed yellowing, reduced growth and deformation of young cladodes. The presence of the phytoplasma in the grafted plants was corroborated by nested PCR with universal primers that amplify a fragment of approximately 1200 bp. Evidence showed that the etiology of cladode thickening in prickly pear is due to *Candidatus* phytoplasma.

Key words: phytoplasma, nested PCR, male cactus plant (*Opuntia ficus indica*).

INTRODUCTION

Prickly pear (*Opuntia ficus-indica*) is a plant native to the semi-arid temperate regions of Mexico. It is widely distributed from Canada to Argentina and it also has spread to African, European and Asian countries. The species is cultivated in 25 countries for its fruits (prickly pears), “nopalitos” or young (stems) and mature cladodes (Callejas *et al.*, 2009). Young cladodes are used as vegetables for salads and special dishes, and mature cladodes are used as fodder, mainly during the dry season (Pimienta,

* Autor para correspondencia ♦ Author for correspondence.

Recibido: octubre, 2018. Aprobado: enero, 2019.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 54: 521-530. 2020.

en 25 países por sus frutos (tunas), los “nopalitos” o cladodios jóvenes (tallos) y maduros (Callejas *et al.*, 2009). Los cladodios jóvenes se usan como verdura para elaborar ensaladas y guisos especiales, y los cladodios maduros se utilizan como forraje, principalmente en la época de estiaje (Pimienta, 1990). Los cladodios poseen compuestos bioactivos con actividades antioxidantes y con potencial de uso en la industria alimenticia y farmacéutica (Bayar *et al.*, 2016; Chaouch *et al.*, 2016) y sus polisacáridos constituyen un adsorbente de metales pesados en agua potable, a costo bajo, (Onditi *et al.*, 2016). Además, extractos de esta planta poseen actividad contra parásitos gastrointestinales en borregos (Féboli *et al.*, 2016).

México es el principal productor internacional de tuna (Flores *et al.*, 1995; SIAP, 2016) y tiene la diversidad genética mayor del género *Opuntia* (Flores y Gallegos, 1993). En 2015 se produjeron 408 000 h de tuna, de las cuales 44% correspondió al estado de México, en particular los municipios San Martín de las Pirámides, Otumba, Axapusco, Nopaltepec y Temascalapa. En Nopaltepec se usaron 2890 ha para producir tuna en ese año (Ramírez *et al.*, 2015).

Diversas enfermedades afectan a este cultivo, en su mayoría causadas por hongos como *Alternaria* sp. y *Macrophomina* sp., y por bacterias (Borrego y Burgos, 1986). La enfermedad “engrosamiento del cladodio” es quizá la más grave (Suaste *et al.*, 2012a; Pimienta, 1990) y es el principal factor limitante de la producción de tunas en México debido a su incidencia alta y diseminación. Las plantas afectadas presentan cladodios con deformación, proliferación de tunas, engrosamiento y detención del crecimiento (Suaste *et al.*, 2012a). Esta enfermedad la causa un fitoplasma (Pimienta, 1990; Bertaccini *et al.*, 2007) que ocasiona un aumento del volumen del parénquima esponjoso, obstrucción del floema, acumulación de mucílago y detención de la brotación con la reducción consiguiente del número de cladodios y flores. Las plantas afectadas producen frutos pequeños, cortos y con cáscara gruesa, carentes de valor comercial (Hernández-Pérez *et al.*, 2009).

En el 2009, en California se encontraron plantas de nopal con síntomas de engrosamiento en las cuales se detectó un virus del género *Umbravirus* (Felker *et al.*, 2009). En 2012 se observó la coinfección de un virus y un fitoplasma en cladodios con engrosamiento en Nopaltepec (Suaste *et al.*, 2012b), pero no se ha demostrado la etiología de la enfermedad en México.

1990). Cladodes have bioactive compounds with antioxidant activities and potential use in the food and pharmaceutical industries (Bayar *et al.*, 2016; Chaouch *et al.*, 2016) and their polysaccharides are a low-cost heavy metal adsorbent in tap water (Onditi *et al.*, 2016). In addition, extracts of prickly pear cactus have shown anti-gastrointestinal parasite activity in sheep (Féboli *et al.*, 2016).

Mexico is the main international producer of prickly pear (Flores *et al.*, 1995; SIAP, 2016) and it harbors the greatest genetic diversity of the genus *Opuntia* (Flores and Gallegos, 1993). In 2015, 408 000 h of prickly pear were produced in Mexico, of which 44% corresponded to the state of Mexico, particularly the municipalities of San Martín de las Pirámides, Otumba, Axapusco, Nopaltepec and Temascalapa. In Nopaltepec, 2890 ha were used to produce prickly pear that year (Ramírez *et al.*, 2015).

Several diseases affect this crop, mostly caused by fungi such as *Alternaria* sp. and *Macrophomina* sp., and by some bacteria (Borrego and Burgos, 1986). However, the disease “cladode thickening” is perhaps the most serious (Suaste *et al.*, 2012a; Pimienta, 1990) and it is the main limiting factor of prickly pear production in Mexico due to high incidence and dissemination. The affected plants present cladodes with deformations, proliferation of prickly pears, thickening and growth reduction (Suaste *et al.*, 2012a). This disease is caused by a phytoplasma (Pimienta, 1990; Bertaccini *et al.*, 2007) that causes an increase in the volume of the spongy parenchyma, phloem obstruction, mucilage accumulation, sprouting inhibition and the consequent reduction in the number of cladodes and flowers. Affected plants produce small, short and thick-shelled fruits, lacking commercial value (Hernández-Pérez *et al.*, 2009).

In 2009, prickly pear cactus with symptoms of thickening were found in California, in which a virus of the genus *Umbravirus* was detected (Felker *et al.*, 2009). In 2012, a virus and phytoplasma coinfection were observed in cladodes with thickening in Nopaltepec (Suaste *et al.*, 2012b), but the disease etiology has not been demonstrated in Mexico. The objective of this research was to determine if the phytoplasma associated with cladode thickening is the causal agent of this disease, and the hypothesis was that prickly pear cactus plants grafted with the phytoplasma would show thickening symptoms.

El objetivo de esta investigación fue determinar si el fitoplasma asociado al engrosamiento de cladodio es el agente causal de esta enfermedad, y la hipótesis fue que los nopales injertados con el fitoplasma mostrarán síntomas de engrosamiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de plantas

En abril de 2013 se recolectaron cladodios de nopal tunero (*Opuntia ficus-indica*) con síntomas de engrosamiento en el municipio de San Martín de las Pirámides, estado de México (Figura 1). Los cladodios se sembraron en macetas con suelo estéril y se mantuvieron en invernadero para su estudio.

MATERIALS AND METHODS

Plant collection

In April 2013, cladodes of prickly pear (*Opuntia ficus-indica*) with symptoms of thickening were collected in the municipality of San Martín de las Pirámides, Mexico (Figure 1). The cladodes were planted in pots with sterile soil and kept in greenhouses for study.

DNA extraction

The DNA was extracted from the upper, middle and basal parts of cladodes showing thickening and yellowing symptoms, as well as from the roots in 18 plants following the method



Figura 1. Plantas de nopal en campo con síntomas asociados a fitoplasma. A) Proliferación de brotes. B) Deformación y engrosamiento de cladodio. C) Amarillamiento y reducción de tamaño de frutos. D) Disminución de la producción de brotes nuevos.

Figure 1. Prickly pear cactus plants in the field with symptoms associated with phytoplasma. A) Sprout proliferation. B) Cladode deformation and thickening. C) Fruit size reduction and yellowing. D) New sprout inhibition.

Extracción del ADN

El ADN se extrajo de la parte superior, media y basal de cladodios que presentaban síntomas de engrosamiento y amarillamiento, así como de la raíz en 18 plantas y el método utilizado fue el descrito por Doyle y Doyle (1990). En todos los casos se maceraron 0.3 g de tejido en morteros con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino al cual se agregó de inmediato 1 g de PVP. Este macerado se colocó en tubos de 1.5 mL con 700 μ L de amortiguador CTAB 3% a 60 °C e incubados en baño María a la misma temperatura (Wheanton Rotary Vacuum Evaporator NE-1) por 30 min con agitación por inmersión cada 10 min. Después se agregaron 600 μ L de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) a los tubos, se agitaron 10 min por inmersión y se centrifugaron a 10 000 *g* a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a tubos de 1.5 mL a los cuales se añadieron 600 μ L de isopropanol frío y se mantuvieron a temperatura ambiente por 30 min. Después se centrifugaron 5 min a 11 200 *g* y se desechó el sobrenadante. La pastilla obtenida se lavó con 800 μ L de etanol 70% y se centrifugó 2 min a 10 000 *g*. La pastilla se secó a 24 °C y se resuspendió en 50 μ L de agua libre de nucleasas.

Detección de fitoplasma por PCR

La PCR anidada se realizó con los iniciadores universales P1 (Deng y Hiruki, 1991) y P7 (Schneider *et al.*, 1995) para fitoplasma, los cuales amplifican un fragmento de 1800 pb (primera amplificación) en un volumen final de 25 μ L 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 se realizó en un termociclador Techne® TC-300 con este programa: desnaturalización a 94 °C por 5 min, seguido por 30 ciclos de 94 °C por 1 min, 57 °C por 1 min, 72 °C por 2 min con una extensión final de 72 °C por 5 min. La segunda amplificación (anidada) se 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 libre de nucleasas estéril 1:20, y las mismas concentraciones y reactivos que en la primera amplificación directa. La amplificación se hizo en un termociclador Thermo scientific (Arktik™) con este programa: desnaturalización a 94 °C por 2 min, seguida de 35 ciclos de 94 °C por 1 min, 55 °C por 2 min, 72 °C por 3 min y una extensión final a 72 °C por 10 min.

described by Doyle and Doyle (1990). In all cases 0.3 g of tissue were macerated in mortars with liquid nitrogen until a fine powder was obtained to which 1 g of PVP was immediately added. This macerate was placed in 1.5 mL tubes with 700 μ L of CTAB 3% buffer at 60 °C and incubated in a water bath at the same temperature (Wheanton Rotary Vacuum Evaporator NE-1) for 30 min with immersion agitation every 10 min. Then 600 μ L of chloroform:isoamyl alcohol (24:1) were added to the tubes, agitated for 10 min by immersion and centrifuged at 10 000 *g* at 4 °C. The supernatant was transferred to 1.5 mL tubes to which 600 μ L of cold isopropanol was added and kept at room temperature for 30 min. Then the tubes were centrifuged for 5 min at 11 200 *g* and the supernatant was discarded. The obtained tablet was washed with 800 μ L of 70% ethanol and centrifuged for 2 min at 10 000 *g*. The tablet was dried at 24 °C and resuspended in 50 μ L of nuclease-free water.

Phytoplasma detection by PCR

Nested PCR was performed with the universal P1 (Deng and Hiruki, 1991) and P7 (Schneider *et al.*, 1995) primers for phytoplasmas that amplify a 1800 bp fragment (first amplification) in a final volume of 25 μ L containing: 1 X of PCR buffer (10 X, 100 mM tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8.3) (Invitrogen®), 0.2 mM of each dNTP, 1.5 mM of MgCl₂ (Invitrogen®), 10 pmol of each primer (Sigma-Aldrich®), 1 U of DNA polymerase (Invitrogen®) and 100 ng of template DNA. Amplification was performed in a Techne® TC-300 thermal cycler with the following program: denaturation at 94 °C for 5 min, followed by 30 cycles of 94 °C for 1 min, 57 °C for 1 min, 72 °C for 2 min with a final extension of 72 °C for 5 min. The second (nested) amplification was performed with the R16F2n / R16R2 primers (Gundersen and Lee, 1996) which amplify a 1200 bp fragment of the 16S rDNA region of the phytoplasma. The amplified product of the first PCR reaction diluted in sterile nuclease-free water 1:20 and the same concentrations and reagents as in the first direct amplification were used as the template DNA. The amplification was done in a Thermo scientific (Arktik™) thermocycler with the following program: denaturation at 94 °C for 2 min, followed by 35 cycles of 94 °C for 1 min, 55 °C for 2 min, 72 °C for 3 min and a final extension at 72 °C for 10 min.

Sequencing and phylogenetic analysis

The positive plant PCR product was purified with the Zymo® Clean Gel DNA Recovery Kit for sequencing at the Laboratorio

Secuenciación y análisis filogenético

El producto de PCR de plantas positivas se purificó con el kit Zymo® Clean Gel ADN Recovery Kit para su secuenciación en el Laboratorio de Biología Molecular del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria-SENASICA. Las secuencias obtenidas se analizaron y compararon con la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, 2016) de EEUU (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y el uso de la herramienta BLAST. Con la secuencia obtenida se realizó un análisis filogenético con otras especies de fitoplasmas. El árbol óptimo se obtuvo con la suma de la longitud de rama = 0.81814157. Para el porcentaje de árboles replicados en los cuales se agruparon los taxones asociados se consideraron 500 repeticiones (bootstrap). El árbol se dibujó a escala, con longitudes de rama en las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol filogenético. Las distancias evolutivas se calcularon con el método de distancia p y están en las unidades del número de diferencias de base por sitio. El análisis involucró 21 secuencias de nucleótidos. Las posiciones de codón incluidas fueron 1o + 2o + 3o + no codificantes. Todas las posiciones que contenían huecos y datos faltantes se eliminaron, hubo un total de 1103 posiciones en el conjunto de datos final. El análisis evolutivo se realizó con el programa MEGA7.

Propagación *in vitro* de *O. ficus-indica*

Para obtener plantas libres de patógenos se establecieron cultivos de cladodios a partir de cultivo de meristemas sanos una vez que se obtuvieron explantes de aproximadamente 10 cm de longitud. El medio MS (Murashige y Skoog, 1962) se complementó con 0.1 mg L⁻¹ de ácido naftalenacético (ANA) y 1.0 mg L⁻¹ de benciladenina (BAP) y se gelificó con agar. Los explantes se incubaron en condiciones de temperatura y luminosidad controladas. Una vez alcanzada una longitud aproximada de 10 cm se realizó el injerto en medios asépticos.

Transmisión por injerto

Debido a que no se contaba con segmentos de cladodios de nopal con síntomas de engrosamiento, amarillamiento, reducción del crecimiento y deformación, se injertaron sobre cladodios (de aproximadamente 20 cm de longitud) de 20 plantas sanas obtenidas por cultivo *in vitro*. Para ello, en la parte media del cladodio sano se realizaron cortes triangulares del borde y se retiraron. Después se cortaron secciones triangulares de cladodios

de Biología Molecular del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria-SENASICA. The sequences obtained were analyzed and compared with the database of the US National Center for Biotechnology Information (NCBI, 2016) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) and the use of the BLAST tool. A phylogenetic analysis with other phytoplasma species was performed with the obtained sequence. The optimal tree was obtained with the sum of branch length = 0.81814157. For the percentage of replicated trees in which the associated taxa were grouped, 500 replications (bootstrap) were considered. The tree was drawn to scale, with branch lengths in the same units as the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree. The evolutionary distances were calculated with the p-distance method and are in the units of the number of base differences per site. The analysis involved 21 nucleotide sequences. The codon positions included were 1st + 2nd + 3rd + non-coding. All positions that contained gaps and missing data were deleted, there were a total of 1103 positions in the final data set. The evolutionary analysis was performed with the MEGA7 program.

In vitro propagation of *O. ficus-indica*

In order to obtain pathogen-free plants, cladode cultures were established from healthy meristem cultures when explants of approximately 10 cm in length were obtained. The MS medium (Murashige and Skoog, 1962) was supplemented with 0.1 mg L⁻¹ naphthaleneacetic acid (ANA) and 1.0 mg L⁻¹ benzyladenine (BAP) and gelled with agar. Explants were incubated under controlled temperature and light conditions. After reaching a length of approximately 10 cm, the grafting was carried out in aseptic media.

Transmission by grafting

Since there were no segments of prickly pear cladodes with symptoms of thickening, yellowing, reduced growth and deformation, they were grafted on cladodes (approximately 20 cm long) of 20 healthy plants obtained by *in vitro* culture. For this purpose, triangular cuts were made in the middle of the healthy cladode and then removed, leaving a gap in the cladode border. Triangular sections of cladodes with symptoms were then cut out to fill those gaps in healthy cladodes. The grafted cladodes were covered with plastic wrap, plants were kept in a controlled environment chamber at 26 °C and a photoperiod of 16 h light, and 8 h dark for 30 d, at the end of which they were analyzed by PCR for phytoplasmas as described above.

con síntomas y se introdujeron en las zonas retiradas de los cladodios sanos. Los cladodios injertados se cubrieron con plástico adherible y las plantas se mantuvieron en cámara de ambiente controlado a 26 °C y un fotoperíodo de 16 h luz y 8 h oscuridad durante 30 d, al término de los cuales se analizaron por PCR para la detección de fitoplasmas de la manera ya descrita.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Daños en plantas injertadas

Todas las plantas injertadas mostraron proliferación de brotes, engrosamiento de cladodios, deformación de frutos y detención de la producción de nuevos brotes (Figura 2).

Los síntomas que se observaron en las plantas de nopal recolectadas en San Martín de las Pirámides en este estudio son diferentes de los hallados por Suaste *et al.* (2012b) en la zona de Nopaltepec, quienes encontraron cladodios con engrosamiento, mosaico, proliferación excesiva de frutos, amarillamiento de pencas y frutos. Estas diferencias pueden deberse a que esos autores detectaron un fitoplasma y, además, un virus. En EE.UU. se informó la presencia de un virus del género *Umbravirus* como el causante del engrosamiento de cladodio (Felker *et al.*, 2009).

Detección de fitoplasmas por PCR

Las plantas sanas injertadas con segmentos de cladodio infectados con fitoplasmas mostraron síntomas y amplificaron por PCR el fragmento esperado para fitoplasmas. En la primera amplificación hecha con los iniciadores P1 / P7 se obtuvo el producto esperado de 1800 pb en los 14 cladodios analizados, mientras que en la segunda amplificación (anidada) sólo en 12 casos se obtuvo el amplicon esperado de 1200 pb (Figura 3).

Secuenciación y análisis filogenético

Con las secuencias se obtuvo una secuencia consenso que mostró 99% de similitud con *Candidatus* Phytoplasma y se depositó en el GenBank (No. de acceso KP271498). El análisis filogenético mostró que el aislamiento obtenido de nopal es muy similar al encontrado por Leyva-López *et al.*, (1999) (Figura 4). La imposibilidad de cultivar estos patógenos *in vitro* involucra un problema mayor para

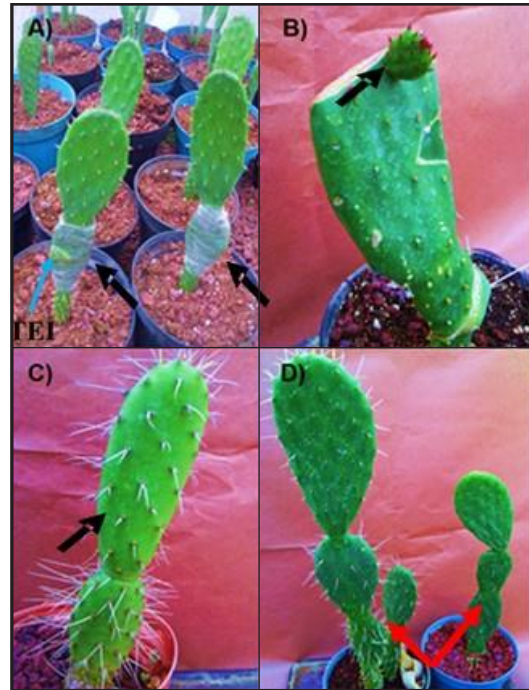


Figura 2. A) Plantas sanas de un mes y medio de edad con tejido enfermo injertado (TEI). B) Deformación de brotes jóvenes. C) Reducción del crecimiento, amarillamiento y engrosamiento. D) Engrosamiento y reducción de producción de nuevos brotes.

Figure 2. A) Healthy plants one and a half month old grafted with ill tissue (TEI). B) Deformation of young sprouts. C) Growth reduction, yellowing and thickening. D) Thickening and new sprouts inhibition.

RESULTS AND DISCUSSION

Damage on grafted plants

All the grafted plants showed sprout proliferation, cladode thickening, fruit deformation and new sprouts inhibition (Figure 2).

The symptoms observed in the prickly pear cactuses collected in San Martin de las Pirámides in this study are different from those found by Suaste *et al.* (2012b) in the Nopaltepec area. They found cladodes with thickening, mosaic, excessive fruit proliferation, and yellowing of stalks and fruits. These differences may be due to the fact that those authors detected phytoplasma and also virus. A virus of the genus *Umbravirus* was reported to be the cause of cladodes thickening in USA (Felker *et al.*, 2009).

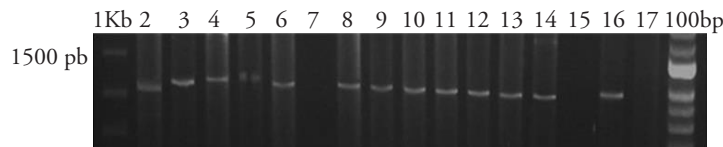


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, del producto de PCR anidada para fitoplasmas con los iniciadores R16F2n y R16R2. Carril 1: marcador de peso molecular 1 kb (Invitrogen®), Carriles 2 a 14: plantas con síntomas que resultaron positivas para fitoplasma, a excepción de los carriles 7 y 15 que fueron negativos. Carril 16: testigo positivo (amarillamiento letal del cocotero). Carril 17: testigo negativo (agua libre de nucleasas, Invitrogen®).

Figure 3. Agarose 1% gel electrophoresis of the nested PCR product for phytoplasmas with R16F2n and R16R2 primers. Lane 1: molecular weight marker 1 kb (Invitrogen®), Lane 2 to 14: plants with symptoms that were phytoplasma positives, except for lanes 7 and 15 which were negative. Lane 16: positive control (lethal yellowing of the coconut tree). Lane 17: negative control (nuclease-free water, Invitrogen®).

su identificación y clasificación, pero gracias a la secuenciación de nucleótidos y el desarrollo de programas para su interpretación se pueden distinguir las relaciones filogenéticas entre los grupos de estos microorganismos.

Phytoplasma detection by PCR

Healthy plants grafted with cladode segments infected with phytoplasmas showed symptoms and amplified by PCR the fragment expected for

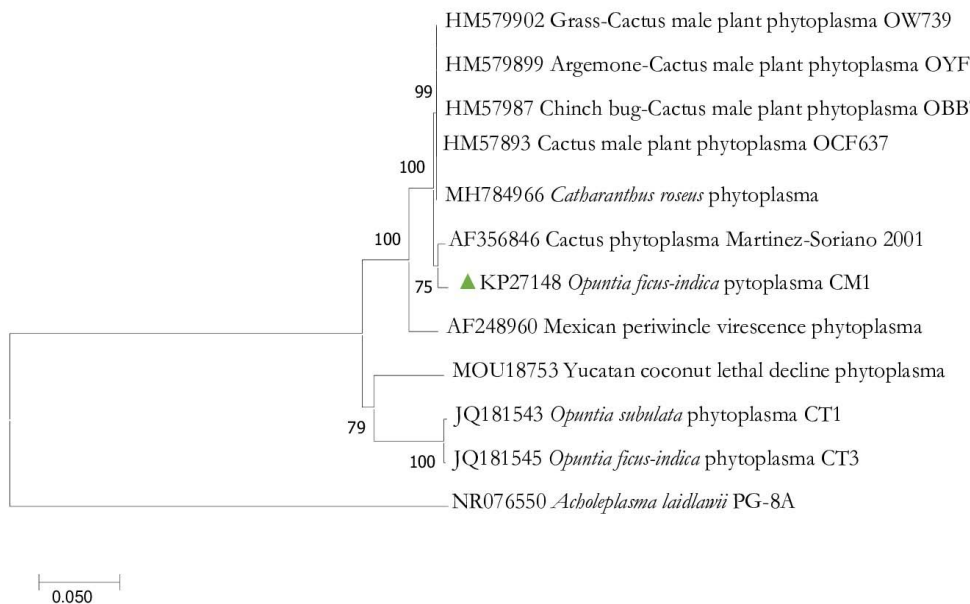


Figura 4. Árbol filogenético que muestra la relación entre *Opuntia ficus-Indica* Phytoplasma (KP271498) identificado en huertos de San Martín de las Pirámides, con diferentes aislamientos de fitoplasmas, y *Candidatus cactus* phytoplasma (AF356846). *Acholeplasma laidlawii* se utilizó como raíz. Las relaciones genéticas se infirieron con el método de vecinos cercanos (Neighbor-Joining). Los análisis evolutivos se realizaron con el programa MEGA. El porcentaje de árboles replicados con los taxones asociados se hizo con 500 bootstrap.

Figure 4. Phylogenetic tree showing the relationship between *Opuntia ficus-Indica* Phytoplasma (KP271498) identified in orchards of San Martín de las Pirámides, with different phytoplasma isolations, and *Candidatus cactus* phytoplasma (AF356846). *Acholeplasma laidlawii* was used as a root. Genetic relationships were inferred with the Neighbor-Joining method. Evolutionary analyses were performed with the MEGA program. The percentage of trees replicated with the associated taxa was done with 500 bootstrap.



Figura 5. Productos de PCR obtenidos con los iniciadores R16F2n y R16R2n en gel de agarosa al 1% en TAE 1X. Los fragmentos amplificados corresponden al gen RNAr 16S de fitoplasmas de plantas de nopal sanas injertadas con segmentos de cladodio infectados con fitoplasma. 1 kb: Marcador de peso molecular de 1 kb (Invitrogen®); Carriles 2 a 7: plantas de nopal que presentaron engrosamiento; (+) Testigo positivo (amarillamiento letal del cocotero); (-) Testigo negativo (agua libre de nucleasas, Invitrogen®).

Figure 5. PCR products obtained with the R16F2n and R16R2n primers in 1% agarose gel in TAE 1X. The amplified fragments correspond to the RNAr 16S gene of phytoplasmas from healthy prickly pear cactus plants grafted with cladode segments infected with phytoplasma. 1 kb: molecular weight of 1 kb marker (Invitrogen®); Lane 2 to 7: prickly pear cactus plants that showed thickening; (+) Positive control (lethal yellowing of the coconut tree); (-) Negative control (nuclease-free water, Invitrogen®).

Transmisión por injerto

Las plantas sanas, injertadas con segmentos de cladodios con síntomas de engrosamiento, expresaron síntomas similares a las plantas recolectadas en campo. A pesar de ello, dos plantas injertadas no resultaron positivas (Figura 5, carriles 3 y 5); en ocasiones los fitoplasmas se concentran en el tejido del floema y en muy bajas concentraciones en el resto de la planta (Wei *et al.*, 2000; Harrison *et al.*, 2002). Por lo tanto en algunas ocasiones es difícil detectarlos y, además, el cultivo de nopal posee grandes cantidades de carbohidratos en un compuesto hidrofílico mucilaginoso, el cual dificulta la extracción de los ácidos nucleicos (Nobel *et al.*, 1992). En Italia, Granata *et al.* (2006) observaron que los síntomas en plantas injertadas comenzaron a aparecer después de dos meses de realizado el injerto, y fueron similares a los de las plantas originales.

Los fitoplasmas son bacterias patógenas carentes de pared celular que infectan numerosas plantas, son parásitos obligados limitados al floema y se transmiten por insectos, estructuras de reproducción vegetativa e injerto (Lee *et al.*, 2010; Tedeschi *et al.*, 2014). Dentro del taxón *Candidatus* Phytoplasma se han propuesto 31 especies (IRPCM, 2004). Diversos aislamientos de dicho grupo están consignados como causantes del amarillamiento letal del cocotero en Mozambique (Bila *et al.*, 2015), del amarillamiento y escoba de bruja de la soya en India (Kumar *et al.*, 2011), y del amarillamiento de la vid (enfermedad de

phytoplasmas. In the first amplification made with P1 / P7 primers, the expected product of 1800 bp was obtained in all of the 14 analyzed cladodes, while in the second amplification (nested) the expected amplicon of 1200 bp was obtained only in 12 cases (Figure 3).

Sequencing and phylogenetic analysis

With the sequences a consensus sequence was obtained which showed 99% similarity to *Candidatus* Phytoplasma and was deposited in GenBank (Access No. KP271498). Phylogenetic analysis showed that the isolation obtained from prickly pear is very similar to that found by Leyva-López *et al.* (1999) (Figure 4). The impossibility of cultivating these pathogens *in vitro* involves a major problem for their identification and classification. However through nucleotide sequencing and the development of programs for their interpretation, the phylogenetic relationships among groups of these microorganisms can be distinguished.

Transmission by grafting

Healthy plants grafted with segments of cladodes with thickening symptoms showed similar symptoms similar to those observed in plants collected in the field. In spite of this, two grafted plants did not test positive (Figure 5, lanes 3 and 5). Sometimes the phytoplasmas are concentrated in the phloem

Blackwood) en viñedos de países europeos del Mediterráneo (Murolo y Romanazzi, 2015). Además, *Candidatus* Phytoplasma es patógeno de cactáceas en el sureste y norte de China, en las provincias de Yunan (Cai *et al.*, 2008; Zheng-Nan *et al.*, 2012) y Shaanxi (Li *et al.*, 2012).

CONCLUSIONES

La transmisión del engrosamiento del cladodio por injerto, y la detección de *Candidatus* Phytoplasma por reacción en cadena de la polimerasa en plantas injertadas confirmaron que este es el agente causal de la enfermedad.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para la investigación y los estudios del primer autor. Al Laboratorio de Biología Molecular del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria-SENASICA por su apoyo para la secuenciación.

LITERATURA CITADA

- Bayar, N., M. Kriaa, and R. Kammoun. 2016. Extraction and characterization of three polysaccharides extracted from *Opuntia ficus indica* cladodes. *Int. J. Biol. Macromol.* 92: 441-450.
- Bertaccini, A., A. Calari, and P. Felker. 2007. Developing a method for phytoplasma identification in cactus pear samples from California. *Bull. Insectol.* 60: 257-258.
- Bila, J., N. Höberg, A. Mondjana, and B. Samils. 2015. African fan palm (*Borassus aethiopum*) and oil palm (*Elaeis guineensis*) are alternate hosts of coconut lethal yellowing phytoplasma in Mozambique. *Afr. J. Biotechnol.* 14: 3359-3367.
- Borrego, E. F., y Burgos V. N. 1986. El Nopal. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Coahuila, México. pp: 7 y 85.
- Callejas, N., J. Matus, J. García, M. Martínez, y J. Salas. 2009. Situación actual y perspectivas de mercado para la tuna, el nopalito y derivados en el Estado de México. *Agrociencia* 43: 73-82.
- Cai, H., W. Wei, R. E. Davis, H. Chen, and Y. Zhao. 2008. Genetic diversity among phytoplasmas infecting *Opuntia* species: virtual RFLP analysis identifies new subgroups in the peanut witches'-broom phytoplasma group. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58: 1448-1457.
- Chaouch, M. A., J. Hafsa, C. Rihouey, D. Le Cerf, and H. Majdoub. 2016. Effect of pH during extraction on the antioxidant and antiglycated activities of polysaccharides from *Opuntia ficus indica*. *J. Food Bioch.* 40: 316-325.
- Deng, S., and C. Hiruki 1991. Genetic relatedness between two nonculturable mycoplasma-like organisms revealed by

tissue but at very low concentrations in the rest of the plant (Wei *et al.*, 2000; Harrison *et al.*, 2002). Therefore, in some cases it is difficult to detect them, and in addition, prickly pear cactus culture has large amounts of carbohydrates in a hydrophilic mucilaginous compound, which makes nucleic acids extraction more difficult (Nobel *et al.*, 1992). In Italy, Granata *et al.* (2006) observed that symptoms in grafted plants began to appear two months after grafting and were similar to those of the original plants.

Phytoplasmas are pathogenic bacteria without a cell wall that infect numerous plants; they are forced parasites limited to phloem and are transmitted by insects, vegetative reproduction structures and grafting (Lee *et al.*, 2010; Tedeschi *et al.*, 2014). Within the *Candidatus* Phytoplasma taxon 31 species have been proposed (IRPCM, 2004). Several isolates from this group are reported to cause lethal coconut yellowing in Mozambique (Bila *et al.*, 2015), soybean yellowing and witches'-broom disease in India (Kumar *et al.*, 2011), and Blackwood's disease in vineyards of European Mediterranean countries (Murolo and Romanazzi, 2015). In addition, *Candidatus* Phytoplasma is a cactus pathogen in southeastern and northern China, in the Yunnan (Cai *et al.*, 2008; Zheng-Nan *et al.*, 2012) and Shaanxi (Li *et al.*, 2012) provinces.

CONCLUSIONS

The transmission of cladode thickening disease by grafting, and the detection of *Candidatus* Phytoplasma by polymerase chain reaction in grafted plants confirmed that this is the causal agent of the disease.

—End of the English version—



- nucleic acid hybridization and polymerase chain reaction. *Phytopathology* 81: 1475-1479.
- Doyle, J. J., and J.L. Doyle .1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
- Féboli, A., A. C. Laurentiz, S. C. S. Soares, J. G. Augusto, L. A. Anjos, L. G. Magalhães, R. S. Filardi, and R. S. Laurentiz. 2016. Ovicidal and larvicidal activity of extracts of *Opuntia ficus-indica* against gastrointestinal nematodes of naturally infected sheep. *Vet. Parasitol.* 226: 65-68.

- Felker, P., R. Bunch, G. Russo, y J. A. Tine. 2009. Progreso en la identificación del agente causal de “Engrosamiento del cladodio o planta macho”. VIII Simposium-Taller Nacional y 1er. Internacional “Producción y Aprovechamiento del Nopal”. Campus de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Escobedo, Nuevo León, México. pp: 37-47.
- Flores, V.C.A., y C. Gallegos V. 1993. Situación y perspectivas de la producción y comercialización de tuna en la región centro y norte de México. CRUCEN-CIESTAAM. Universidad Autónoma Chapingo. pp: 5-27.
- Flores, V. C. A., J. M. de Luna E., y P. P. Ramírez M. 1995. Mercado Mundial del Nopalito. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo México. 176 p.
- Granata, G., S. Paltrinieri, S. Botti, and A. Bertaccini. 2006. Aetiology of *Opuntia ficus-indica* malformations and stunting disease. *Ann. Appl. Biol.* 149: 317-325.
- Gundersen, D. E., and I. M. Lee. 1996. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathol. Mediterr.* 35: 144-151.
- Harrison, N. A., W. Myrip, P. Jones, M. L. Carpioi, M. M. Castillo, M. Doyle, and C. Oropeza. 2002. 16SrRNA interperon sequence heterogeneity distinguishes strain populations of palm lethal yellowing phytoplasma in the Caribbean region. *Ann. Appl. Biol.* 141: 183-193.
- Hernández-Pérez, R., J. C. Noa-Carrazana, R. Gaspar, P. Mata, and N. Flores-Estévez. 2009. Detection of phytoplasma on indian fig (*Opuntia ficus-indica* Mill) in Mexico central region. *OnLine J. Biol. Sci.* 9: 62-66.
- IRPCM (International Research Programme on Comparative Mycoplasmaology). 2004. Phytoplasma/Spiroplasma Working Team – Phytoplasma Taxonomy Group ‘*Candidatus* Phytoplasma’, a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 1243-55.
- Kumar, P. L., K. Sharma, H. Tefera, S. Boahen, and M. Tamò. 2011. First report of soybean witches’-broom disease caused by group 16SrII Phytoplasma in soybean in Malawi and Mozambique. *Plant Dis.* 95: 492.
- Lee, I. M., K. D. Bottner-Parker, Y. Zhao, R. E. Davis, and N. A. Harrison. 2010. Phylogenetic analysis and delineation of phytoplasmas based on secY gene sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60: 2887-2897.
- Leyva-López, N. E., D. S. Aguilar R., D. S. Leal-Klevezas, and J. P. Martínez-Soriano. 1999. Presence of phytoplasmas in Mexican cacti. *Phytopathology* 89: S45.
- Murolo, S., and G. Romanazzi. 2015. In-vineyard population structure of ‘*Candidatus* Phytoplasma solani’ using multilocus sequence typing analysis. *Infect. Genet. Evol.* 31: 221-230.
- Murashige, F., and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid grow and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- NCBI (National Center for Biotechnology Information). 2016. Blast®. www.ncbi.nlm.nih.gov/ (Consulta: noviembre 2016).
- Nobel, P. S., J. Cavelier, and J. L. Andrade. 1992. Mucilage in cacti: Its apoplastic capacitance, associated solutes, and influence on tissue water relations. *J. Exp. Bot.* 43: 641-648.
- Onditi, M., A. A. Adelodun, E. O. Changamu, and J. C. Ngila. 2016. Removal of Pb²⁺ and Cd²⁺ from drinking water using polysaccharide extract isolated from cactus pads (*Opuntia ficus-indica*). *J. Appl. Polym. Sci.* 43913: 1-9.
- Pimental, B. E. 1990. El Nopal Tunero. Universidad de Guadalajara. CECSA Guadalajara, Jalisco, México. 246 p.
- Ramírez, A. O., H. Figueroa E., y T. L. Espinosa E. 2015. Análisis de rentabilidad de la tuna en los municipios de Nopaltepec y Axapusco, estado de México. *Rev. Mex. Agron.* 19: 1199-1210.
- Suaste-Dzul, A., R.I. Rojas-Martínez, E. Zavaleta-Mejía y D. Pérez-Brito. 2012a. Detección molecular de fitoplasmas en nopal tunero (*Opuntia ficus-indica*) con síntomas de engrosamiento del cladodio. *Rev. Mex. Fitopatol.* 30:1-9.
- Suaste-Dzul, A. R.I. Rojas-Martínez, D. Ochoa-Martínez, E. Zavaleta-Mejía, D. Pérez-Brito, C. Hernández-Juárez and D. Rodríguez-Martínez. 2012b. Virus associated with thickening of the cladodes of prickly pear (*Opuntia ficus-indica* Mill.). *J. Biotechnol. Biodivers.* 4:100-107.
- Wei, W., H. Kawakita, and M. Sato. 2000. Detection of a small population of mulberry dwarf (MD)-phytoplasmas in symptomless-mulberry trees by nested PCR. *J. Sericult. Sci. Jpn.* 69:261-269.