

IDENTIFICACIÓN DE UN AISLAMIENTO DEL GRUPO 16SRIII, *Candidatus* *Phytoplasma pruni* EN PLANTAS Y SEMILLAS DE AMARANTO (*Amaranthus hypochondriacus* L.) EN MÉXICO

IDENTIFICATION OF AN ISOLATE FROM GROUP 16SRIII, *Candidatus* *Phytoplasma pruni* IN PLANTS AND SEEDS OF AMARANTH (*Amaranthus hypochondriacus* L.) IN MÉXICO

Reyna I. Rojas-Martínez^{1*}, Emma Zavaleta-Mejía¹, Ing-Ming Lee², Agustín Aragón-García³

¹Fitopatología, Campus Montecillo, Colegio de Postgraduados. 56230. Km 36.5. Carretera México-Texcoco. Montecillo, Estado de México, México. (rojas@colpos.mx). ²Molecular Plant Pathology, USDA-ARS, Beltsville, Maryland 20705, USA. ³Departamento de Agroecología y Ambiente, Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. 72570. 14 Sur 6301. Colonia San Manuel, Puebla, Puebla.

RESUMEN

Recientemente en el estado de Tlaxcala, México el “síntoma de escoba de bruja” (proliferación de brotes y reducción de entrenudos) fue observado en amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L.). Esta sintomatología en campo se distribuye uniformemente en la plantación y no en forma azarosa y de manchones; además, el mayor daño es en la panícula que aloja a las semillas lo cual genera considerables pérdidas en la cosecha. Por tanto, el objetivo del presente trabajo fue determinar la presencia de fitoplasmas en plantas con síntomas de escoba de bruja y en semillas provenientes de plantas enfermas. En todas las muestras procesadas se encontró asociado un fitoplasma perteneciente al grupo 16Sr III, según los resultados de la comparación de los patrones generados con enzimas de restricción de los productos amplificados por PCR. Las secuencias de los productos obtenidos presentaron similitud de 98 % con el grupo filogenético 16Sr III *Candidatus* *Phytoplasma pruni*.

Palabras clave: *Amaranthus*, *Candidatus* *Phytoplasma pruni*, reacción en cadena de la polimerasa, RFLP.

INTRODUCCIÓN

El cultivo del amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L.) ha tenido gran relevancia en México desde tiempos prehispánicos para rituales religiosos y como parte de la dieta. Las especies de *Amaranthus* son cultivadas en varias partes del

ABSTRACT

Recently in the state of Tlaxcala, México, the “witches’ broom syndrome” (proliferation of shoots and reduction of internodes) was observed in amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.). This symptomatology in the field is uniformly distributed in the plantation rather than randomly or in patches, and the most severe damage is in the panicle which contains the seeds, generating considerable losses in the harvest. Therefore, the objective of the present study was to determine the presence of phytoplasmas in plants with symptoms of witches’ broom syndrome and in seeds from diseased plants. In all of the samples that were processed an associated phytoplasma was found pertaining to the group 16Sr III, according to the results of the comparison of the patterns generated with enzymes of restriction of the products amplified by PCR. The sequences of the products obtained presented similarity of 98 % with the phylogenetic group 16Sr III *Candidatus* *Phytoplasma pruni*.

Key words: *Amaranthus*, *Candidatus* *Phytoplasma pruni*, chain reaction of the polymerase, RFLP.

INTRODUCTION

The cultivation of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) has had great relevance in México since prehispanic times for religious rituals and as part of the diet. The species of *Amaranthus* are cultivated in various parts of the world: *A. cruentus* L. in the eastern part of North America, México, Central and South America; *A. hypochondriacus* L. in Tlaxcala, Puebla and Morelos; *A. caudatus* L. in Ecuador, Perú, Bolivia,

*Autor responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: Mayo, 2008. Aprobado: Abril, 2009.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 43: 851-860. 2009.

mundo: *A. cruentus* L. en el este de Norteamérica, México, Centro y Sudamérica; *A. hypochondriacus* L. en Tlaxcala, Puebla y Morelos; *A. caudatus* L. en Ecuador, Perú, Bolivia, Argentina, Asia y Oceanía (Mosyakin y Robertson, 2003).

Algunas especies de *Amaranthus* son cultivadas tanto con fines alimenticios para obtener grano y hojas y tallos usados en la preparación de ensaladas, como ornamentales (Brenner *et al.*, 2000; Williams y Brenner 1995; Bianco *et al.*, 1998). Las especies comúnmente cultivadas son *A. caudatus* L., *A. hypochondriacus* y *A. cruentus* L. originarias de América, y *A. tricolor* L. del sur de Asia. La importancia en México ha aumentado por el elevado contenido proteico y de aminoácidos esenciales para el ser humano (Rodríguez, 2000), por el rápido crecimiento, la capacidad de crecer en condiciones de baja humedad y estrés hídrico, y por producir rendimientos aceptables de grano con pocas labores de cultivo (Blodgett *et al.*, 2000). En 2005 el estado de Puebla fue el mayor productor de amaranto (51 %) en México, seguida por los estados de Morelos (22 %), Tlaxcala (18 %), Distrito Federal (19 %), Estado de México (6 %) y Guanajuato (2 %). De acuerdo con el Servicio de Información Estadística Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), en 2005 la cosecha de amaranto fue 2917 t; en 2006, Puebla aportó 2219 t, Morelos 214 t, Tlaxcala 190 t, Estado de México 153 t, y el Distrito Federal 136 t (SAGARPA, 2006).

Existe relativamente poca información acerca de las plagas y enfermedades que afectan a las distintas especies de *Amaranthus*. Sólo hay reconocidas enfermedades de naturaleza fungosa, bacteriana, viral y las causadas por nematodos. En México, los patógenos que afectan a este cultivo son *Choanephora cucurbitarum* Thakker que induce la pudrición húmeda del tallo; la secadera inducida por *Pythium aphanidermatum* (Ed.) Fitzp; la roya blanca por *Albugo bliti* (Biv) Kuntze (Grubben, 1975, citado por Espitia, 1986); la mancha negra del tallo por *Macrophoma* sp.; y el carbón del amaranto por *Thecaphora amaranthi* (Hirschh.) Vánky (Hirschhorn, 1986; Vánky, 1994; Moreno-Velázquez, 2005). De las enfermedades bacterianas *A. hybridus* se reporta como hospedante de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (E.F.Sm.) (Huerta y Rodríguez, 1994), y de las de naturaleza viral el virus *Amaranthus Mottle Virus* (AMoV) afecta a *A. blitum* L., *A. caudatus* L., *A. cruentus* L., *A. gracilis* L., *A. hypochondriacus* L., *A. leucocarpus* L., *A. spinosus*

Argentina, Asia and Oceania (Mosyakin and Robertson, 2003).

Some species of *Amaranthus* are cultivated both for alimentary purposes to obtain grain and leaves and stems used in the preparation of salads, as well as for ornamental purposes (Brenner *et al.*, 2000; Williams and Brenner, 1995; Bianco *et al.*, 1998). The commonly cultivated species are *A. caudatus* L., *A. hypochondriacus* from America and *A. cruentus* L. from southern Asia. Its importance in México has increased because of its high protein content and of essential aminoacids for humans (Rodríguez, 2000), its rapid growth, its capacity to grow under conditions of low moisture and water stress, and because it produces acceptable grain yields with a low degree of labor (Blodgett *et al.*, 2000). In 2005 the state of Puebla was the major producer of amaranth (51 %) in México, followed by the states of Morelos (22 %), Tlaxcala (18 %), Federal District (19 %), State of México (6 %) and Guanajuato (2 %). According to the Servicio de Información Estadística Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), in 2005 the amaranth harvest was 2917 t; in 2006, Puebla supplied 2219 t, Morelos 214 t, Tlaxcala 190 t, State of México 153 t, and the Federal District 136 t (SAGARPA, 2006).

There is relatively little information of the pests and diseases that affect the different species of *Amaranthus*. Only diseases of a fungal, bacterial, and viral nature are recognized, as well as those caused by nematodes. In México, the pathogens that affect this crop are *Choanephora cucurbitarum* Thakker which induces wet rot of the stem; the wilting induced by *Pythium aphanidermatum* (Ed.) Fitzp; white rust by *Albugo bliti* (Biv) Kuntze (Grubben, 1975, cited by Espitia, 1986); black spot of the stem by *Macrophoma* sp.; and the amaranth carbon by *Thecaphora amaranthi* (Hirschh.) Vánky (Hirschhorn, 1986; Vánky, 1994; Moreno-Velázquez, 2005). Of the bacterial diseases, *A. hybridus* is reported as host of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (E.F. Sm.) (Huerta and Rodríguez, 1994), and of the viral infections, the virus *Amaranthus Mottle Virus* (AMoV) affects *A. blitum* L., *A. caudatus* L., *A. cruentus* L., *A. gracilis* L., *A. hypochondriacus* L., and *A. leucocarpus* L., *A. spinosus* L., *A. tricolor* L., and *A. viridis* L., reducing plant growth and grain production, as well as delaying flowering (Sánchez *et al.*, 1990).

L., *A. tricolor* L., y *A. viridis* L., reduciendo el crecimiento de la planta y la producción de grano además de retrasar la floración (Sánchez *et al.*, 1990).

En relación con las enfermedades causadas por fitoplasmas, riketsias y bacterias fastidiosas hay una enfermedad causada por un fitoplasma que reduce el crecimiento del tallo y el área foliar (Ruskin, 1984); sin embargo, no se aclara si dicho diagnóstico fue realizado considerando sólo la sintomatología o mediante microscopía electrónica y pruebas con antibióticos para inducir la remisión de síntomas. Borth *et al.* (2006) reportaron también la presencia del fitoplasma del grupo 16SrI en amaranto, sin describir la sintomatología inducida. En México se ha presentado una enfermedad de etiología desconocida en el estado de Tlaxcala; las plantas enfermas presentan proliferación de la panícula, amarillamiento foliar, acortamiento de entrenudos, y en algunas los brotes nuevos son raquíuticos y amarillentos (observación personal de Reyna I. Rojas-Martínez). Esta sintomatología corresponde a lo comúnmente conocido como escoba de bruja y que frecuentemente se asocia con infecciones por fitoplasmas (Rojas-Martínez *et al.*, 2003; Luna-Esquivel *et al.*, 2004).

El fitoplasma del amarillamiento letal del cocotero es transmitido vía el embrión de coco (Cordova *et al.*, 2003) pero no se ha demostrado la presencia de fitoplasmas en esta estructura. La escoba de bruja del amaranto en el campo se distribuye uniformemente en la plantación y no en forma azarosa y de manchones. Además el mayor daño se aprecia en la panícula que aloja a las semillas, lo cual sugiere que el patógeno involucrado pudiera ser diseminado a través de la semilla. Por tanto, el objetivo del presente trabajo fue determinar la presencia de fitoplasmas en plantas con síntomas de escoba de bruja y evaluar la posible transmisión por semilla.

MATERIALES Y MÉTODOS

Detección de fitoplasmas asociados con la escoba de bruja

Cincuenta plantas de amaranto en estado de floración con síntomas de escoba de bruja y 50 plantas sin síntomas se recolectaron en un lote comercial de San Miguel del Milagro, Tlaxcala. Con las 50 plantas se hicieron cinco grupos de 10; los tallos, hojas e inflorescencia de cada grupo de plantas se mezclaron para formar una muestra compuesta de cada órgano. Se prepararon

With respect to the diseases caused by phytoplasmas, rickettsiae and harmful bacteria, there is a disease caused by a phytoplasma that reduces stem growth and leaf area (Ruskin, 1984); however, it is not clear whether this diagnosis was made considering only the symptomatology or by means of electronic microscope and tests with antibiotics to induce the remission of symptoms. Borth *et al.* (2006) also reported the presence of the phytoplasma of the group 16SrI in amaranth without describing the induced symptomatology. In México a disease with unknown etiology has appeared in the state of Tlaxcala; the diseased plants present proliferation of the panicle, foliar yellowing, shortening of the internodes, and in some cases the new shoots are rachitic and yellow (personal observation of Reyna I. Rojas-Martínez). This symptomatology corresponds to what is commonly known as witches' broom syndrome and is frequently associated with infections by phytoplasmas (Rojas-Martínez *et al.*, 2003; Luna-Esquivel *et al.*, 2004).

The phytoplasma of the lethal yellowing of the coconut palm is transmitted via the coconut embryo (Cordova *et al.*, 2003), but the presence of phytoplasmas of this structure has not been demonstrated. Witches' broom of amaranth in the field is uniformly distributed in the plantation rather than randomly and in patches. Furthermore, most of the damage is observed in the panicle which contains the seeds, which suggests that the pathogen involved could be spread through the seed. Therefore, the objective of the present work was to determine the presence of phytoplasmas in plants with symptoms of witches' broom and to evaluate the possible transmission through the seed.

MATERIALS AND METHODS

Detection of phytoplasmas associated with witches' broom

Fifty amaranth plants in the flowering stage with symptoms of witches' broom and 50 plants without symptoms were collected in a commercial plot of San Miguel del Milagro, Tlaxcala. With the 50 plants, five groups of 10 were made; the stems, leaves and inflorescence of each group of plants were mixed to form a composed mixture of each organ. Two groups of 50 seeds were prepared; one of panicles with symptoms and another of the asymptomatic panicles. The seeds were disinfested with sodium hypochlorite at 1.0 %, then were

dos grupos de 50 semillas; uno de panículas con síntomas y otro de las asintomáticas. Las semillas se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1.0 %, se secaron con toallas sanitarias, se colocaron en charolas germinadoras con papel absorbente humedecido con agua destilada estéril, y se incubaron 7 d a 27 °C. Las semillas germinadas se separaron en dos grupos de 25. De esta manera se obtuvieron dos repeticiones de semillas de panículas sintomáticas y dos de las asintomáticas, haciendo la extracción de ADN para cada repetición.

La extracción de ADN de tejido de cada muestra compuesta de plantas con síntomas, de las asintomáticas y de las semillas germinadas se hizo de acuerdo con el protocolo descrito por Ahrens y Seemüller (1992). El ADN de referencia se extrajo de plantas de *Catharanthus roseus* L. G. Don, infectadas con el fitoplasma del amarillamiento del áster, subgrupo B (16SrI-B), mantenidas en nuestro laboratorio. La cantidad y calidad del ADN extraído se determinó mediante espectrofotometría (Lambda Bio mod. 10, PERKIN ELMER®) a una absorbancia de 260 nm y por electroforesis en gel de poliacrilamida. La detección de fitoplasmas mediante PCR directa se realizó con los iniciadores universales para fitoplasmas P1/P7 (Deng y Hiruki, 1991), que flanquean las regiones génicas del ADNr 16S y el espaciador intergénico 16/23S y que generan un fragmento de aproximadamente 1800 pb. Con los productos de PCR directa se realizó una PCR anidada con los iniciadores R16F_{2n}/R16R₂ que amplifican un fragmento de aproximadamente 1200 pb, correspondiente a la región parcial del ADNr 16S (Lee *et al.*, 1993).

La primera amplificación (PCR-directa) se realizó con la siguiente mezcla de reacción: amortiguador de ADN polimerasa amplificasa BIOGENICA® 1X, 2.5 mM de MgCl₂, 200 µM de dNTP (deoxinucleótidos trifosfatados), iniciadores (20 pmol) P1/P7; 1 U µL⁻¹ de ADN polimerasa (amplificasa de BIOGENICA®); 80 ng de ADN total para cada mezcla de reacción en un volumen final de 25 µL. Las muestras se amplificaron en un termociclador automático (GeneAmp PCR System mod. 2400, PERKIN-ELMER®) con el siguiente ciclo: un ciclo de desnaturalización inicial a 94 °C por 1 min; 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 1 min, alineamiento a 55 °C por 2 min y una extensión a 72 °C por 3 min y un ciclo de extensión final a 72 °C por 7 min. Cinco µL del producto de PCR se cargaron en un gel de agarosa al 1 % y se corrieron en electroforesis a 90 V. Al finalizar la corrida, el gel se tiñó con bromuro de etidio (0.5 µg mL⁻¹) durante 10 min, para analizarlo con el fotodocumentador Gel-Doc mod. 2000 (BIO-RAD®). Como referencia del peso molecular se utilizó el marcador 1Kb (Fermentas®).

Para realizar la PCR-anidada se diluyó 1 µL del producto de PCR-directa en 30 µL de agua deionizada estéril para utilizar 1 µL de la dilución como molde para la PCR-anidada, en las

dried with sanitary towels, placed on germination trays with absorbant paper moistened with sterile distilled water, and were incubated 7 d at 27 °C. The germinated seeds were separated into two groups of 25. In this manner two replicates of seeds were obtained from symptomatic panicles and two of the asymptomatic ones, making the extraction of DNA for each replicate.

The extraction of DNA from tissue of each composed sample of plants with symptoms of the asymptomatic plants and of the germinated seeds was made according to the protocol described by Ahrens and Seemüller (1992). The reference DNA was extracted from plants of *Catharanthus roseus* L. G. Don, infected with the phytoplasma of Aster Yellows disease, subgroup B (16SrI-B), maintained in our laboratory. The quantity and quality of the extracted DNA was determined through spectrophotometry (Lambda Bio mod. 10, PERKIN ELMER®) at an absorbancy of 260 nm and by electrophoresis in polyacrylamid gel. The detection of phytoplasmas through direct PCR was made with the universal primers for phytoplasmas P1/P7 (Deng and Hiruki, 1991), that flank the genetic regions of the 16S DNAr and the intergenetic spacer 16/23S and that generate a fragment of approximately 1800 pb. With the products of direct PCR, a nested-PCR was made with the primers R16F_{2n}/R16R₂ which amplify a fragment of approximately 1200 pb, corresponding to the partial region of the 16S DNAr (Lee *et al.*, 1993).

The first amplification (direct PCR) was made with the following reaction mixture: buffer of DNA polymerase amplificase BIOGENICA® 1X, 2.5 mM of MgCl₂, 200 µM of dNTP (triphosphated deoxynucleotides), primers (20 pmol) P1/P7; 1 U µL⁻¹ of DNA polymerase (amplificase of BIOGENICA®); 80 ng of total DNA for each reaction mixture in a final volume of 25 µL. The samples were amplified in an automatic thermocycler (GeneAmp PCR System mod. 2400, PERKIN-ELMER®) with the following cycling: a cycle of initial denaturalization at 94 °C for 1 min; 35 cycles of denaturalization at 94 °C for 1 min, alignment at 55 °C for 2 min and an extension at 72 °C for 3 min and a final extension cycle at 72 °C for 7 min. Five µL of the product of PCR were loaded in an agarose gel at 1 % and were run in electrophoresis at 90V. At the end of the run, the gel was stained with etidium bromide (0.5 µg mL⁻¹) during 10 min, to be analyzed with the photodocumenter Gel-Doc mod. 2000 (BIO-RAD®). As reference of the molecular weight, the marker 1Kb (Fermentas®) was used.

To make the nested-PCR, 1 µL of the product of direct PCR was diluted in 30 µL of sterile de-ionized water to use 1 µL of the dilution as a mold for the nested-PCR, under the described conditions, with the difference of the pair of primers R16F_{2n}/R16R₂ (Gundersen and Lee, 1996).

condiciones descritas, con la diferencia del par de iniciadores R16F₂n/R16R₂ (Gundersen y Lee, 1996).

Para determinar el grupo al cual pertenece el fitoplasma detectado, el fragmento amplificado se sometió a un análisis de RFLP, para lo cual, los productos de PCR anidada (iniciadores R16F₂n/R16R₂) fueron digeridos con endonucleasas de restricción (*AluI*, *KpnI*, *HhaI*, *MseI*, *HpaII* y *Tsp* 5091). Los productos de restricción fueron separados en geles de acrilamida 8 % y teñidos con bromuro de etidio. Los patrones de RFLP obtenidos se compararon con los reportados en la literatura (Lee *et al.*, 1998).

Secuenciación y análisis del 16S rDNA

El producto de PCR anidada fue purificado (Wizard (PROMEGA®), clonado (TOPO-TA (INVITROGEN®) y secuenciado (Automatic Sequencer 3700xl DNA Analyzer, APPLIED BIOSYSTEM®). Las secuencias del ADNr 16S obtenidas fueron comparadas con las de referencia en el GenBank, usando la herramienta BLAST del Centro Nacional de Información Biotecnológica (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Análisis filogenético

Las relaciones filogenéticas entre el fitoplasma detectado en plantas de amaranto con síntoma de escoba de bruja con aislamientos de otros grupos de fitoplasmas fueron determinadas con base en la secuencia del gen que codifica para el ADNr 16S. El árbol filogenético fue construido de acuerdo con los resultados del análisis de Parsimonia (PAUP versión 4.0b, D. Swofford). La secuencia parcial del fitoplasma Ph Amaranto y las de los aislamientos *Ca. Phytoplasma pruni*-16SrIII-B (D12580), *Ca. Phytoplasma pruni*-16SrIII-F (AF510724), *Ca. Phytoplasma pruni*-16SrIII-H (EU165359), *Ca. Phytoplasma pruni*-16SrIII-G (AF190227), *Ca. Phytoplasma pruni*-16SrIII-J (AF147706), *Ca. Phytoplasma pruni*-16SrIII-I (AF060875), *Ca. Phytoplasma pruni*-16SrIII-E (AF190228), *Ca. Phytoplasma fraxini*-16SrVII (AF092209), *Ca. Phytoplasma luffae*-16SrVIII (AF086621), *Ca. Phytoplasma cynodontis*-16SrXIV (AJ550984), *Ca. Phytoplasma oryzae*-16SrXI (AB052873), *Ca. Phytoplasma palmae*-16SrIV (U18747), *Ca. Phytoplasma phoenicium*-16SrIX (AF515636), *Ca. Phytoplasma aurantifolia*-16SrII (U15442), *Ca. Phytoplasma ulmi*-16SrX (AJ542541), *Ca. Phytoplasma ulmi*-16SrV (AY197655), *Ca. Phytoplasma brasiliense*-16SrXV (AF147708), *Ca. Phytoplasma asteris*-16SrI (M30790), fitoplasmas que inducen la filodia del cempazuchil (AY249248), JazN, Virescencia del jazmín (EU252563); PaWB, escoba de bruja de la paulonia (AY265206), OAY, virescencia de la oenothera (M30790), *A. laidlawii* (M23932) de referencia del GenBank,

To determine the group to which the detected phytoplasma belonged, the amplified fragment was subjected to an analysis of RFLP, for which the products of nested-PCR (primers R16F₂n/R16R₂) were digested with endonucleases of restriction (*AluI*, *KpnI*, *HhaI*, *MseI*, *HpaII* and *Tsp* 5091). The restriction products were separated in acrylamid gels 8 % and stained with etidium bromide. The patterns of RFLP obtained were compared with those reported in the literature (Lee *et al.*, 1998).

Sequencing and analysis of the 16S rDNA

The product of nested-PCR was purified (Wizard PROMEGA®), cloned (TOPO-TA (INVITROGEN®) and sequenced (Automatic Sequencer 3700xl DNA Analyzer, APPLIED BIOSYSTEM®). The sequences obtained of 16S DNAr were compared with the reference sequences in the GenBank, using the tool BLAST of the National Center of Biotechnological Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Phylogenetic analysis

The phylogenetic relationships among the phytoplasma detected in plants of amaranth with symptom of witches' broom with isolates of other groups of phytoplasmas were determined based on the sequence of the gene that codifies for 16S DNAr. The phylogenetic tree was constructed according to the results of the analysis of Parsimonia (PAUP version 4.0b, D. Swofford). The partial sequence of the phytoplasma Ph Amaranto and those of isolates of *Ca. Phytoplasma pruni*-16SrIII-B (D12580), *Ca. Phytoplasma pruni*-16SrIII-F (AF510724), *Ca. Phytoplasma pruni*-16SrIII-H (EU165359), *Ca. Phytoplasma pruni*-16SrIII-G (AF190227), *Ca. Phytoplasma pruni*-16SrIII-J (AF147706), *Ca. Phytoplasma pruni*-16SrIII-I (AF060875), *Ca. Phytoplasma pruni*-16SrIII-E (AF190228), *Ca. Phytoplasma fraxini*-16SrVII (AF092209), *Ca. Phytoplasma luffae*-16SrVIII (AF086621), *Ca. Phytoplasma cynodontis*-16SrXIV (AJ550984), *Ca. Phytoplasma oryzae*-16SrXI (AB052873), *Ca. Phytoplasma palmae*-16SrIV (U18747), *Ca. Phytoplasma phoenicium*-16SrIX (AF515636), *Ca. Phytoplasma aurantifolia*-16SrII (U15442), *Ca. Phytoplasma ulmi*-16SrX (AJ542541), *Ca. Phytoplasma ulmi*-16SrV (AY197655), *Ca. Phytoplasma brasiliense*-16SrXV (AF147708), *Ca. Phytoplasma asteris*-16SrI (M30790), phytoplasmas that induce phyloidy of the cempazuchil (AY249248), JazN, Virescence of jazmin (EU252563); PaWB, witches' broom of paulonia (AY265206), OAY, virescence of oenothera (M30790), *A. laidlawii* (M23932) of reference of the GenBank, were aligned using the Clustal 5 of the Software Laser Gene of the program DNASTAR, Madison, WI, USA.

fueron alineadas usando el Clustal 5 del Software Laser Gene del programa DNASTAR, Madison, WI, EE.UU.

RESULTADOS

Mediante la PCR directa realizada con los iniciadores P1/P7 no fue posible detectar la presencia de fitoplasmas en el ADN de semillas germinadas de plantas enfermas, ni de ninguna muestra de tejido de plantas con escoba de bruja. Sin embargo, la PCR anidada evidenció la presencia de ADN fitoplásmico de peso molecular esperado de 1.2 kb cuyo tamaño coincide con el reportado por Lee *et al.* (1993) (Figura 1). El fragmento sólo fue detectado en tallo, hoja e inflorescencia y semillas germinadas provenientes de plantas con síntomas. La secuencia del amplicón clonado se depositó en el GenBank (Núm. de Acceso EU310514). El fragmento obtenido mostró una identidad de 99 % con el grupo 16Sr III *Candidatus* Phytoplasma pruni (IRPCM, 2004), la cual fue confirmada a través del análisis de RFLP del producto de PCR anidada con las endonucleasas de restricción *AluI*, *KpnI*, *HhaI*, *MseI*, *HpaII* y *Tsp* 5091. El patrón obtenido indicó que el fitoplasma detectado en plantas de amaranto con síntoma de escoba de bruja pertenece al grupo 16S rDNA III (Figura 2).

La posición taxonómica se confirmó comparando las secuencias del fragmento de 1.2 kb 16SrDNA amplificado (Núm. de acceso EU310514) con las secuencias de aislamientos depositadas en el GenBank. El análisis del árbol filogenético mostró una estrecha relación con el fitoplasma del grupo 16Sr III *Candidatus* Phytoplasma pruni (Figura 3).

DISCUSIÓN

La presencia de fitoplasmas perteneciente al grupo 16Sr III fue detectada en tejido de plantas de amaranto con el síntoma de escoba de bruja provenientes del estado de Tlaxcala. El haber amplificado el fragmento correspondiente a este fitopatógeno en las semillas germinadas de plantas enfermas, mantenidas aisladas para evitar el contacto con insectos vectores, sugiere que el fitoplasma estaba presente en la semilla. Sin embargo, para confirmar que ocurre la transmisión por semilla habrá que demostrar la consistencia de los resultados aquí reportados. Hasta ahora, sólo se ha consignado la transmisión de fitoplasmas a través de insectos vectores y mediante

RESULTS

Through direct PCR made with the primers P1/P7, it was not possible to detect the presence of phytoplasmas in the DNA of germinated seeds of diseased plants, nor of any tissue sample of plants with witches' broom. However, the nested-PCR showed the presence of phytoplasmic DNA of expected molecular weight of 1.2 kb, whose size coincides with that reported by Lee *et al.* (1993) (Figure 1). The fragment was only detected in stem, leaf and inflorescence and germinated seeds

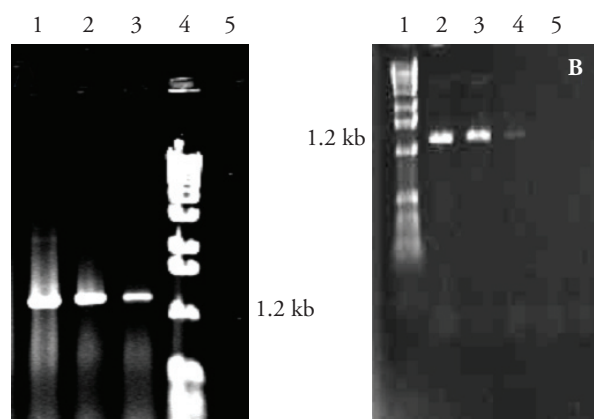


Figura 1. A) Productos de PCR anidada con los iniciadores R16F_{2n} y R16 R₂: carril 1, testigo positivo de referencia 16SrI-B de *C. roseus* infectadas con el fitoplasma del amarillamiento del áster; carriles 2 y 3, tejido de amaranto con síntomas de escoba de bruja; carril 4, marcador de peso molecular 1kb (Fermentas®); carril 5, planta sana de amaranto. B) Productos de PCR anidada con los iniciadores R16F_{2n} y R16 R₂: carril 1, marcador de peso molecular 1kb (Fermentas®); carril 2, testigo positivo de referencia 16SrI-B de *C. roseus* infectadas con el fitoplasma del amarillamiento del áster; carriles 3 y 4, muestras de semillas germinadas; carril 5, tejido de planta sana de amaranto.

Figure 1. A) Products of nested-PCR with the primers R16F_{2n} and R16 R₂: row 1, positive control of reference 16sRi-B of *C. roseus* infected with the phytoplasma of Aster Yellows disease; rows 2 and 3, tissue of amaranth with symptoms of witches' broom; row 4, marker of molecular weight 1kb (Fermentas®); row 5, healthy amaranth plant. B) Products of nested-PCR with the primers R16F_{2n} and R16 R₂: row 1, molecular weight marker 1kb (Fermentas®); row 2, positive control of reference 16sRi-B of *C. roseus* infected with the phytoplasma of Aster Yellows disease; rows 3 and 4, samples of germinated seeds; row 5, tissue of healthy amaranth plant.

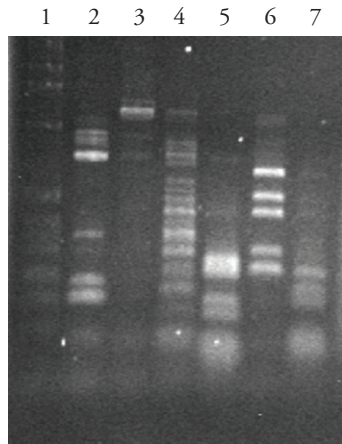


Figura 2. Productos de PCR anidada con los iniciadores R16F₂n y R16 R₂ digeridos con las endonucleasas de restricción; carril 1, marcador de peso molecular 1kb; carril 2, *AluI*; carril 3, *KpnI*; carril 4, *Hpa* II; carril 5, *HbaI*; carril 6, *MseI*; y carril 7 *Tsp* 5091.

Figure 2. Products of nested PCR with the primers R16F₂n and R16 R₂ digested with the endonucleases of restriction; row 1, molecular weight marker 1kb; row 2, *AluI*; row 3, *KpnI*; row 4, *Hpa* II; row 5, *HbaI*; row 6, *MseI*; and row 7, *Tsp* 5091.

material vegetativo como varetas, bulbos, rizomas y tubérculos (Rojas-Martínez *et al.*, 2002; Cervantes-Díaz *et al.*, 2004). Estos patógenos pueden colonizar el floema de plantas vasculares y el intestino medio, la hemolinfa y las glándulas salivales de sus insectos vectores (Kirkpatrick, 1992; Lee *et al.*, 2000). En la planta hospedante los fitoplasmas se distribuyen sistémicamente y pueden multiplicarse en células del parénquima del floema, células parenquimatosas que separan los fascículos vasculares y en células de la zona más externa del sistema vascular (Siller *et al.*, 1987). Lo anterior indica que la translocación sistémica del patógeno podría ocurrir a través del sistema conductor, o mediante conexiones plasmodesmáticas (Esau *et al.*, 1976). Así, la llegada del fitoplasma a la semilla podría darse a través de este tipo de conexiones en las células de la misma; no obstante, esto implicaría que el fitoplasma puede entrar en estados de reposo que le permitieran sobrevivir en el interior de las células inactivas de las semillas maduras. Tal capacidad no sería necesaria en el caso de semillas de algunas gramíneas (trigo, maíz y cebada) y dicotiledóneas como *Ricinus communis* L. que tienen una capa formada por células vivas que contienen granos de aleurona (proteína de reserva); sin embargo, las semillas de amaranto están desprovistas de aleurona (Casasola, 1996).

from plants with symptoms. The sequence of the cloned amplicon was deposited in the Gen Bank (Access Num. EU310514). The obtained fragment showed an identity of 99 % with the group 16Sr III *Candidatus* Phytoplasma pruni (IRPCM, 2004), which was confirmed through the analysis of RFLP of the product of nested-PCR with the endonucleases of restriction *AluI*, *KpnI*, *HbaI*, *MseI*, *HpaII* and *Tsp* 5091. The obtained pattern indicated that the phytoplasma detected in amaranth plants with symptom of witches' broom belongs to the group 16SrDNA III (Figure 2).

The taxonomic position was confirmed by comparing the sequences of the fragment of 1.2 kb 16SrDNA amplified (Access Num. EU310514) with the sequences of isolates deposited in the GenBank. The analysis of the phylogenetic tree showed a close relationship with the phytoplasma of the group 16Sr III *Candidatus* Phytoplasma pruni (Figure 3).

DISCUSSION

The presence of phytoplasmas pertaining to the group 16Sr III was detected in tissue of amaranth plants with witches' broom symptom from the state of Tlaxcala. Having amplified the fragment corresponding to this phytopathogen in the germinated seeds of diseased plants, maintained isolated to prevent contact with vector insects, suggests that the phytoplasma was present in the seed. However, to confirm that the transmission through the seed occurs, it will be necessary to demonstrate the consistency of the results reported here. Until now, only the transmission of phytoplasmas has been consigned through insect vectors and through vegetative material such as scions, bulbos, rhizomes and tubers (Rojas-Martínez *et al.*, 2002; Cervantes-Díaz *et al.*, 2004). These pathogens can colonize the phloem of vascular plants and the middle intestine, the hemolymph and saliva glands of their insect vectors (Kirkpatrick, 1992; Lee *et al.*, 2000). In the host plant the phytoplasmas are systematically distributed and can multiply in cells of the parenchyma of the phloem, parenchymatose cells that separate the vascular fascicles and in cells of the most external zone of the vascular system (Siller *et al.*, 1987). The above indicates that the systematic translocation of the pathogen could occur through the conduction system, or through plasmodesmic connections (Esau

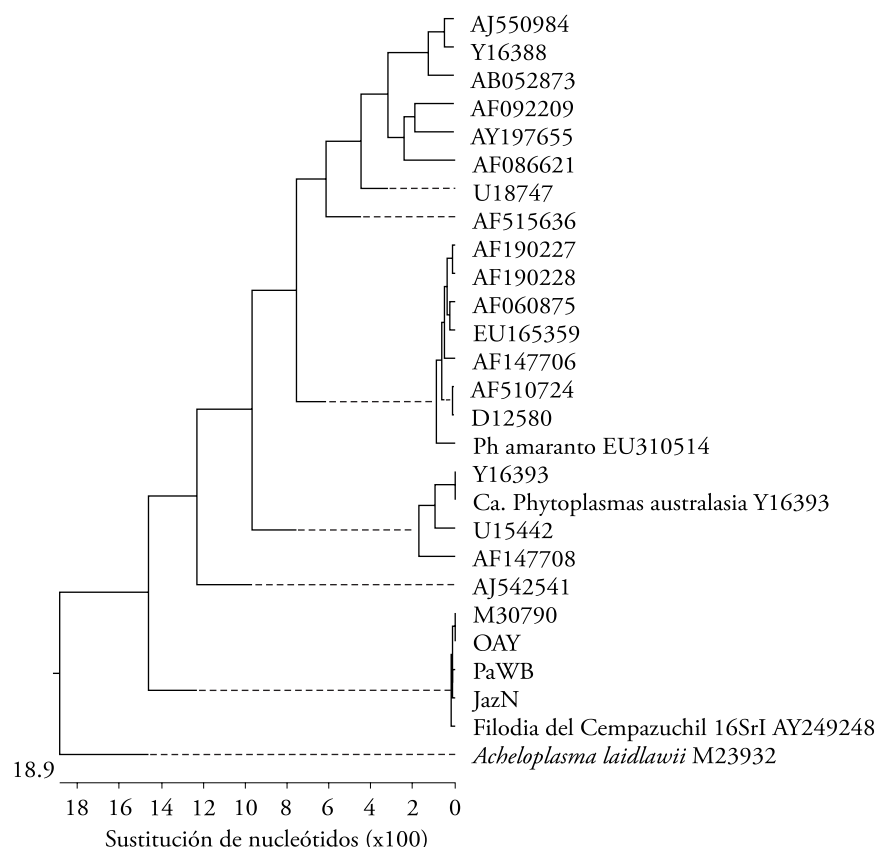


Figura 3. Relaciones filogenéticas establecidas entre Ph Amaranto y secuencias de nucleótidos de fitoplasmas de referencia contenidas en el Genbank cuyos números de accesiones y grupos se especifican. Las líneas horizontales son proporcionales al número de diferencias de nucleótidos entre los nodos de las ramas. La escala indica una sustitución por cada 100 nucleótidos. Solamente se muestran valores de confianza (bootstraps) mayores de 50. Se usó *Acheloplasma laidlawii* como raíz del árbol.

Figure 3. Phylogenetic relationships established between Ph Amaranth and sequences of nucleotides of phytoplasmas of reference contained in the GenBank whose numbers of accessions and groups are specified. The horizontal lines are proportional to the number of differences of nucleotides between the nodes of the branches. The scale indicates a substitution for every 100 nucleotides. Only confidence values (bootstraps) of over 50 are shown. *Acheloplasma laidlawii* was used as tree root.

Dado que los fitoplasmas pueden alcanzar niveles epidémicos causando daños económicos significativos, y que en México la semilla usada para nuevas siembras proviene de cosechas anteriores, es de particular relevancia el hecho de que en las semillas germinadas provenientes de plantas enfermas se haya detectado a un fitoplasma.

CONCLUSIONES

En plantas de amaranto con el síntoma de esca-ba de bruja y en semillas germinadas provenientes de plantas enfermas se encontró asociado un fitoplasma perteneciente al grupo 16Sr ADN III.

et al., 1976). Thus, the arrival of the phytoplasma to the seed could occur by means of this type of connections in the cells of the seed; however, this would imply that the phytoplasma can enter in states of repose which would allow it to survive in the interior of the inactive cells of the mature seeds. This capacity would not be necessary in the case of seeds of some gramineas (wheat, maize and barley) and dicotyledoneae such as *Ricinus communis* L. which have a layer formed by live cells that contain grains of aleuron (reserve protein); however, the seeds of amaranth do not contain aleuron (Casasola, 1996).

Given that the phytoplasmas can reach epidemic levels causing significant economic damages, and that

LITERATURA CITADA

- Ahrens, U., and E. Seemüller. 1992. Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma like organism by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology* 82: 828-832.
- Bianc, V. V., P. Santamaria, and A. Elia. 1998. Nutritional value and nitrate content in edible wild species used in southern Italy. *Acta Hort.* 467: 71-87.
- Blodgett J. T., S. M. Louw, and W. J. Week. 2000. Species composition of endophytic fungi in *Amaranthus hybridus* leaves, petioles, stems, and roots. *Mycologia* 92: 853-859.
- Borth, W. B., S. K. Fukuda, R. T. Hamasaki, J. S. Hu, and R. P. Almeida P. 2006. Detection, characterisation and transmission by *Macrostelus* leafhoppers of watercress yellows phytoplasma in Hawaii. *Annual Appl. Biol.* 149: 357-363.
- Brenner, D. M., D. D. Baltensperger, P. A. Kulakow, J. W. Lehmann, R. L. Myers, M. M. Slabbert, and B. B. Sleugh. 2000. Genetic resources and breeding of *Amaranthus*. *Plant Breeding Rev.* 19: 227-285.
- Casasola, M., P. 1996. Vida y Obra de Granos y Semillas. Fondo de Cultura Económica. http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen3/ciencia3/146/htm/sec_3.htm. Consultado el 12 de febrero de 2008.
- Centro Nacional de Información Biotecnológica (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Consultado el 28 de noviembre de 2008.
- Cervantes-Díaz, L., E. Zavaleta-Mejía, R. I. Rojas-Martínez, I. Alanís-Martínez, D. L. Ochoa-Martínez, y P. Sánchez-García. 2004. Primer reporte de la presencia de fitoplasmas en plantas de *Alstroemeria* sp., en México. *Rev. Mex. Fitopatol.* 22: 134-139.
- Cordova, I., P. Jones, N. Harrison, and C. Oropeza. 2003. *In situ* detection of phytoplasma DNA in embryos from coconut palms with lethal yellowing disease. *Mol. Plant Pathol.* 4: 99-108.
- Deng, S., and C. Hiruki. 1991. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and nonculturable Mollicutes. *J. Microbiol. Methods* 14: 53-61.
- Espitia, R. E. 1986. Situación actual y problemática del cultivo del amaranto en México. In: *Memorias Primer Seminario Nacional del Amaranto*. Universidad Autónoma Chapingo (ed). Chapingo, México. 577 p.
- Esau, K., A. C Magyarosy, and V. Breazeale. 1976. Studies of the mycoplasma-like organism (MLO) in spinach leaves affected by Aster Yellows Disease. *Protoplasma* 90: 189-203.
- Gundersen, D. E., and I.-M. Lee. 1996. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathol. Mediterranea* 35: 144-151.
- Hirschhorn, E. 1986. Las Ustilaginales de la Flora Argentina. Comisión Nacional de Investigación Científica (ed). Provincia de Buenos Aires. Publicación especial. La Plata, Argentina. 530 p.
- Huerta, L. M., and M. L. Rodríguez. 1994. Survival of the causal agent of common bean blight, *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (E.F.Sm.) in soil and in the rhizosphere of some weeds at Chapingo, Mexico State. *Rev. Chapingo* 1: 29-33.
- IRPCM Phytoplasma/spiroplasma working team-phytoplasma taxonomy group. 2004. *Candidatus* Phytoplasma, a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize in México the seed used for new sowings comes from previous harvests, it is of particular relevance that a phytoplasma has been detected in the germinated seeds from diseased plants.

CONCLUSIONS

In amaranth plants with the symptom of witches' broom and in germinated seeds from diseased plants, a phytoplasma was found belonging to the group 16Sr DNA III.

—End of the English version—



- plant phloem and insects. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 1243-1255.
- Lee, I.-M., R. Hammond, and D. E. Gundersen-Rindal. 1993. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology* 83: 834-842.
- 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. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48: 1153-1169.
- Lee, I.-M., R. E. Davis, and D. E. Gundersen-Rindal. 2000. Phytoplasma: phytopathogenic mollicutes. *Ann. Rev. Microbiol.* 54: 221-255.
- Luna-Esquivel G., R. I. Rojas-Martínez, E. Zavaleta-Mejía, y O. Martínez de la Vega. 2004. Primer reporte del fitoplasma Pigeon Pea Withes Broom en México. *Rev. Mex. Fitopatol.* 22: 125-128.
- Kirkpatrick, B. C. 1992. Mycoplasma-like organisms: plant and invertebrate pathogens. In: Trüper, A. G., H. M. Dworkin, W. Harder, and H. Schleifer K. (eds). *The Prokaryotes*. Balows, Springer. New York. pp: 4050-4067.
- Moreno-Velázquez M., M. J. Yáñez-Morales, R. I. Rojas-Martínez, E. Zavaleta-Mejía, y A. Trinidad-Santos. 2005. Diversidad de hongos en semillas de Amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L.) y su caracterización molecular. *Rev. Mex. Fitopatol.* 23: 111-118.
- Mosyakin, S. L., and K. R. Robertson. 2003. *Amaranthus*. In: *Flora of North America Editorial Committee* (eds). *Flora of North America North of Mexico*, Vol. 4. Magnoliophyta: Caryophyllidae. Oxford Univ. Press. New York. 398 p.
- Rodríguez, V. J. 2000. Historia de la Fitosanidad en México. Siglo XXI. D. F. México. 280 p.
- Rojas-Martínez, R. I., E. Zavaleta-Mejía, I.-M. Lee, M. Martín, and H. S. Azpiroz. 2003. Detection and characterization of the phytoplasma associated with marigold phyllody cosmos in Mexico. *J. Plant Pathol.* 84: 81-86.
- Rojas-Martínez, R. I., E. Zavaleta-Mejía, H. S. Azpiroz, and I. M. Lee. 2002. Identification of the phytoplasma associated with cosmos (*Cosmos bipinnatus*) phyllody by RFLP analysis of 16S rDNA. *Rev. Mex. Fitopatol.* 21: 83-86.

- Ruskin, R. F. 1984. Amaranth. Modern Prospects for an Ancient Crop. Nacional Academy Press, Washington, D. C. 81p.
- Sánchez, E., M. C., S. Osada K. D., Téliz, O., E. Espitia R., y G. Rendón S. 1990. Etiología e incidencia de la mancha negra del tallo en *Amaranthus* sp. y otras enfermedades. Rev. Mex. Fitopatol. 8: 102-106.
- SAGARPA. 2006. <http://www.sagarpa.gob.mx/cgcs/boletines/2006/enero/B024.htm>. Consultado el 9 de octubre del 2008.
- Siller, W., R. Kuhbandner, R. Marwitz, H. Petzold, and E. Seemüller. 1987. Occurrence of mycoplasmas-like organism in parenchyma cell of *Cuscuta odorata* (Ruiz et Pav). J. Phytopathol. 119: 147-159.
- Vánky, K. 2002. Illustrated Genera of Smut Fungi. 2nd edition. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota. USA. 238 p.
- Williams, J. T., and D. Brenner. 1995. Grain amaranth (*Amaranthus* species). In: Williams, J. T. (ed). Cereals and Pseudocereals. Chapman and Hall. London. UK. pp: 129-186.