

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS

ESCUELA DE PREGRADO

MEMORIA DE TÍTULO

**TRANSMISIÓN DE FITOPLASMAS POR EL CICADELIDO *Bergallia valdiviana*
Berg 1881.**

NICOLÁS OSVALDO QUIROGA BARRERA

Santiago, Chile

2015

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS

ESCUELA DE PREGRADO

MEMORIA DE TÍTULO

**TRANSMISIÓN DE FITOPLASMAS POR EL CICADÉLIDO *Bergallia valdiviana*
Berg 1881.**

**PHYTOPLASMAS TRANSMISSION BY THE LEAFHOPPER *Bergallia valdiviana*
Berg 1881.**

NICOLÁS OSVALDO QUIROGA BARRERA

Santiago, Chile

2015

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS

ESCUELA DE PREGRADO

MEMORIA DE TÍTULO

**TRANSMISIÓN DE FITOPLASMAS POR EL CICADÉLIDO *Bergallia valdiviana*
Berg 1881.**

Memoria para optar al título profesional de
Ingeniero Agrónomo

NICOLÁS OSVALDO QUIROGA BARRERA

Profesor Guía	Calificación
Nicola Fiore. Ingeniero Agrónomo, Dr. Cs.	7,0
Profesores Evaluadores	
Jaime Auger S. Ingeniero Agrónomo, MS. Ph.D.	6,0
Loreto Prat. Ingeniero Agrónomo, Mg. Sc. Dr.	7,0

Santiago, Chile

2015

LA VIDA ES MUY CORTA PARA ESPERAR
QUE LAS COSAS PASEN.

A MI MADRE, FAMILIA, AMIGOS, PROFESORES, Y
A TODOS LOS QUE ME AYUDARON A LOGRAR QUE
COSAS COMO ÉSTAS OCURRAN.

ÍNDICE

Página

RESUMEN.....	1
Palabras claves	1
ABSTRACT	2
Key words.	2
INTRODUCCIÓN	3
Hipótesis	5
Objetivo.....	5
MATERIALES Y MÉTODOS	6
Lugar de estudio.....	6
Materiales.....	6
Metodología	6
Captura de insectos y caracterización taxonómica	6
Pruebas de Transmisión	8
Caracterización molecular de fitoplasmas en vincas y langostinos	10
Extracción de DNA total	10
Detección de fitoplasmas por nested PCR	11
Gen 16S rRNA	12
Electroforesis	12
Ligación de los productos de PCR en el vector de clonación	13
Transformación de las células competes.....	13
Obtencion de secuencias	14
Identificacion molecular	14
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	15
Colecta de insectos.....	15
Pruebas de transmisión.....	17
Detección de fitoplasmas por nested PCR	19
Caracterización de fitoplasmas por análisis de secuencia y RFLP <i>in silico</i>	21
Sintomatología de las plantas de vinca positivas a fitoplasmas.....	27
CONCLUSIONES	32
BIBLIOGRAFÍA	33
ANEXO I	37

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Partidores universales para la detección de gen 16S rRNA	12
Cuadro 2. Número de Insectos por jornada de captura.	15
Cuadro 3. Números de insectos utilizados en cada prueba de transmisión.....	18
Cuadro 4. Porcentaje de identidad nucleotídica de secuencias nucleotídicas entre los aislados de vinca y <i>B.valdiviana</i> (gen 16S rRNA) y los registrados en GenBank.....	23

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Síntoma de fitoplasmosis en el viñedo de Casablanca	7
Figura 2. Tubos de ensayo con insectos colectados en terreno.....	8
Figura 3. Planta de vinca utilizada en las pruebas de transmisión.....	9
Figura 4. Jaulas entomológicas	9
Figura 5. Distribución de insectos por jornada de captura	16
Figura 6. Abundancia relativa de <i>B. valdiviana</i> durante el periodo de colecta	17
Figura 7. Distribución promedio de la sobrevivencia de insectos en las pruebas de transmisión	19
Figura 8. Amplificación de nested PCR con los partidores R16F2n/R2 (gen 16S rRNA) de plantas de vinca e insectos <i>B. valdiviana</i> en las pruebas de transmisión.....	20
Figura 9. Perfiles de RFLP <i>in silico</i> digeridos con la enzima <i>HhaI</i>	24
Figura 10. Perfiles de RFLP <i>in silico</i> digeridos con la enzima <i>BstUI</i>	25
Figura 11. Perfiles de RFLP <i>in silico</i> digeridos con la enzima <i>RsaI</i>	26
Figura 12. Síntomas de las plantas positivas a fitoplasmas a los 6 meses después de realizada la prueba de transmisión	27
Figura 13. Síntomas de las plantas positivas a fitoplasmas a los 10 meses después de realizada la prueba de transmisión	28
Figura 14. Síntomas a los 14 meses de la Vinca positiva 62A	29
Figura 15. Síntomas a los 14 meses de la Vinca positiva 64B.....	30
Figura 16. Comparación entre una planta positiva a fitoplasmas y un control negativo	31

RESUMEN

Bergallia valdiviana Berg 188, perteneciente a la familia Cicadellidae, es uno de los insectos más comunes en los viñedos chilenos. En algunos individuos de *B. valdiviana* se ha detectado la presencia de un fitoplasma perteneciente al subgrupo ribosomal 16SrIII-J. Sin embargo, no hay informaciones acerca de su capacidad de transmitir fitoplasmas. Durante octubre de 2012 a Junio de 2013, en un viñedo infectado con fitoplasmas ubicado en la localidad de Casablanca, Región de Valparaíso, se capturaron individuos adultos de *B. valdiviana* para realizar pruebas de transmisión en jaulas entomológicas utilizando plantas de vinca (*Cantharanthus roseus* L.) obtenidas desde semillas. Las capturas se realizaron utilizando una red entomológica. Dos de catorce pruebas resultaron exitosas en la transmisión del fitoplasma 16SrIII-J (relacionado con '*Candidatus* Phytoplasma pruni'; X-disease group) a las plantas de vinca, las cuales presentaron fuertes amarilleces en hojas y desordenes en las flores. La detección e identificación del fitoplasma se realizó a través de PCR anidado, secuenciación y RFLP *in silico*. Los resultados del presente trabajo indican, por primera vez, que *B. valdiviana* es vector del fitoplasma 16SrIII-J.

Palabras claves: Auchenorrhyncha, nested PCR, gen 16S rRNA, RFLP, secuenciación, X-disease group, insecto vector.

ABSTRACT

Bergallia valdiviana Berg 1881, belonging to the family Cicadellidae, is one of the most common insects in Chilean vineyards. Several individuals of *B. valdiviana* have been previously reported to be carriers of a phytoplasma belonging to ribosomal subgroup 16SrIII-J. However, there is no information about its capacity to transmit this phytoplasma to plant hosts.

From October 2012 to June 2013, a wide number of *B. valdiviana* adults were captured in phytoplasma infected vineyards located in the locality of Casablanca, in Valparaiso region, in order to perform transmission trials in entomological cages. Non infected periwinkles (*Cantharanthus roseus* L.) obtained from seeds were used as indicator plants. Catches were made using an entomological net. In 2 out of 14 trials was observed transmission of 16SrIII-J phytoplasma (related to '*Candidatus* Phytoplasma pruni'; X-disease group) to periwinkle plants, which showed strong yellowing, disorders in leaves and flowers. Detection and identification of the phytoplasma was carried out by nested PCR, sequencing and *in silico* RFLP. The results of this study indicate for the first time, that *B. valdiviana* is vector of the phytoplasma 16SrIII-J.

Key words: Auchenorrhyncha, nested PCR, 16S rRNA gene, RFLP, sequencing, X-disease group, insect vector.

INTRODUCCIÓN

Los fitoplasmas son procariotas pertenecientes a la clase Mollicutes, carentes de pared celular, característica que le permite gran plasticidad, pleomorfismo, resistencia a las moléculas antibacterianas que degradan o inhiben la síntesis de péptido glucano, y sensibles a las tetraciclinas. Estos parásitos obligados inducen enfermedades de importancia económica en varias especies de interés agronómico, forestal y ornamental (Avinent y Llácer, 1996).

Los fitoplasmas se transmiten a través de la propagación de material vegetal infectado, pero no por transmisión mecánica. En la naturaleza son diseminados por insectos que se alimentan en el floema, pertenecientes a la orden Hemiptera, principalmente de las familias Cicadellidae, Cixiidae y Psyllidae. También pueden ser transmitidos por plantas parásitas como *Cuscuta sp.* (Avinent y Llácer, 1996; Laviña y Batlle, 1997).

Los síntomas generales que presentan las plantas infectadas con fitoplasmas son amarilleces, enrojecimiento precoz de las hojas en frutales de hoja caduca, esterilidad de las flores, virescencia, filodia, escobas de brujas (proliferación de yemas adventicias), enanismo generalizado, enrrollamiento de las hojas, necrosis del floema y decaimiento general (Avinent y Llácer, 1996; Laviña y Batlle, 1997; Laviña *et al.*, 2000). En el caso de infectar a la vid, estos patógenos raramente causan la muerte de la planta (esto ocurre frecuentemente solo con infecciones de “Flavescence dorée”), sí afectan enormemente los rendimientos y la calidad de la fruta, acortando la vida útil de la plantas que también son más susceptibles a otros agentes dañinos como hongos e insectos (Bennett *et al.*, 1967).

La detección de los fitoplasmas resulta complicada debido a su distribución irregular y a la baja concentración de los mismos en los tejidos vegetales infectados (Namba *et al.*, 1993; Avinent y Llácer, 1994; Lee *et al.*, 1994; Lorenz *et al.*, 1995; Avinent y Llácer, 1996; Gundersen y Lee, 1996; Green *et al.*, 1999). La detección se puede realizar a través de microscopía óptica (tinción DAPI) o electrónica, serología (dot blot, ELISA), técnicas híbridas como ISEM (serología asociada a microscopía electrónica), hibridación molecular (Ahrens y Seemüller, 1992; Lee *et al.*, 1994; Lorenz *et al.*, 1995; Gundersen y Lee, 1996; Laviña y Batlle, 1997; Green *et al.*, 1999; Waterwork y Mock, 1999); sin embargo, estos métodos poseen una sensibilidad limitada, no son prácticos para trabajar un gran número de muestras y algunos de ellos no permiten realizar la identificación del fitoplasma encontrado.

La principal técnica usada para detectar e identificar fitoplasmas tanto en plantas como en insectos vectores es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) asociada al análisis del polimorfismo del largo de los fragmentos de restricción (RFLP) (Vega *et al.*, 1993; Avinent y Llácer, 1996; Gundersen y Lee, 1996; Green *et al.*, 1999; Waterwork y Mock, 1999). Con PCR se amplifican zonas del gen 16S rRNA a través de partidores específico para la detección de fitoplasmas (Ahrens y Seemüller, 1992; Namba *et al.*, 1993; Avinent y Llácer,

1994; Lee *et al.*, 1994; Avinent y Llácer, 1996; Gundersen y Lee, 1996; Laviña y Batlle, 1997). Esta técnica posee la ventaja de ser versátil, de relativa simplicidad, especificidad, y de alta sensibilidad; además, el patógeno no necesita ser purificado antes del análisis (Henson y French, 1993; Lorenz *et al.*, 1995). El método PCR/RFLP es una muy buena herramienta para garantizar el buen estado sanitario del material vegetal destinado a la propagación (FIA, 2009).

Para aumentar la sensibilidad del PCR se utiliza un método definido como “nested” (o “anidado”), que consiste en una primera amplificación por medio de PCR con partidores universales, cuyo producto se somete a un segundo ciclo de PCR. En esta segunda etapa se utiliza otra pareja de partidores universales o específicos capaces de amplificar una zona interna del producto de la primera amplificación, lo que permite mejorar la sensibilidad de la técnica (FIA, 2009).

En viñedos chilenos infectados con fitoplasmas, muchos insectos Auchenorrhyncha fueron capturados e identificados, la mayoría de ellos pertenecientes a las subfamilias Delthocephalinae y Agallinae (familia Cicadellidae) y a las familias Cixiidae y Delphacidae, todas conocidas por incluir especies potenciales vectores de fitoplasmas. Entre las especies más frecuentes, positivas a fitoplasmas, se encuentran *Amplicephalus curtulus* linnavuori & De Long, *Paratanus exitiosus* (Beamer) y *Bergallia valdiviana* Berg 1881 (Fiore *et al.*, 2008; 2011). *P. exitiosus* y *A. curtulus* han sido descritos respectivamente como vectores de los fitoplasmas 16SrIII-J y 16SrV-A. Mientras no existe información acerca de la capacidad de transmitir fitoplasmas por *B. valdiviana* (Arismendi *et al.*, 2011; Longone *et al.*, 2011; Fiore *et al.*, 2012).

B. valdiviana es un insecto endémico de Chile, mientras que el género *Bergallia* es propio de Latinoamérica (Catalogue of life, 2011). Este cicadélido no ha sido descrito como agente perjudicial en cultivos, sin embargo el género *Bergallia* se ha asociado al cultivo de la zanahoria en Argentina, mientras en Chile se ha asociado al cultivo del arándano, siendo un género cuarentenario para Estados Unidos (Casals, 2009; Dughetti y Lanati, 2013).

Por consiguiente, determinar si *B. valdiviana* es un vector de fitoplasmas, como también conocer otras especies de vectores, resultará de gran importancia para el sector agrícola (especialmente vitivinícola), dado que existen antecedentes sobre las pérdidas económicas que están produciendo estos patógenos.

Hipótesis

El cicadélido *Bergallia valdiviana* Berg 1881, es vector de fitoplasmas.

Objetivo

Determinar la capacidad de transmisión de fitoplasmas por el cicadélido *B. valdiviana*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de estudio

Esta investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Fitovirología del Departamento de Sanidad Vegetal y las pruebas de transmisión en una sala de invernadero de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile.

Materiales

Para la captura de insectos se utilizó una red entomológica, tubos de ensayo de vidrio, algodón y una nevera de 15 litros para el transporte del material. Para la identificación de los insectos encontrados se trabajó con una Lupa binocular LEICA S6D.

En cuanto a los materiales requeridos para las pruebas de transmisión, estos fueron: jaulas entomológicas, plantas de *Cantharanthus roseus* L. G. Don y tubos eppendorf.

Para la Extracción de DNA fue necesario: mortero, micropipetas, tampón de extracción (100 mM tris pH 8, 20 mM EDTA; 1,4 M NaCL; 3% W/v CTAB), mercaptoetanol al 0,2 % (v/v), tubos eppendorf, cloroformo, centrífuga refrigerada, isopropanol, etanol al 70 % y cámaras de refrigeración (Zhang *et al.*, 1998).

Para PCR y nested PCR se utilizaron partidores universales para la detección de fitoplasmas, enzima Taq Polimerasa, tampón 10X, agua destilada y termociclador (Romero, 1997).

Finalmente se requirió de azul de bromofenol, glicerol, gel de agarosa al 1%, bromuro de etidio, instrumental para la electroforesis y transiluminador de luz ultra violeta, para visualizar los productos de amplificación de PCR.

Metodología

Captura de insectos y caracterización taxonómica

La captura de insectos se realizó en un viñedo variedad Pinot noir ubicado en la comuna de Casablanca (Región de Valparaíso). Se visitó catorce veces, desde finales de Octubre de 2012 hasta finales de Junio de 2013, cada 15-20 días, para realizar las pruebas de transmisión siguiendo el ciclo vegetativo de la vid. La elección del viñedo se realizó basándose en antecedentes que indicaban la presencia de plantas infectadas por fitoplasmas (Figura 1).



Figura 1. Var. Pinot noir con síntoma de fitoplasmosis.

La captura de insectos se efectuó con una red entomológica orientada hacia las malezas presentes en la entre hilera del viñedo. Los individuos capturados se colocaron en tubos de ensayo con un tapón de algodón y una porción de maleza para evitar la deshidratación de los insectos hasta el momento de su introducción en las jaulas entomológicas para las pruebas de transmisión (Fig. 2). Los insectos fueron trasladados al laboratorio en una nevera con 15°C.

La identificación a nivel de especie se realizó bajo lupa, basándose en las características morfológicas (color, dibujo de la zona dorsal, forma de la cabeza y tamaño) (Anexo I). La identificación de los insectos Auchenorrhyncha capturados se realizó mediante la comparación con fotografías tomadas anteriormente por el Dr. Alberto Alma de la Universidad de Turín, Italia, quien identificó previamente los cicadélidos presentes más abundantes en la zona central del país, a través de genitalia y micromorfología.



Figura 2. Tubos de ensayo con insectos colectados en terreno

Pruebas de Transmisión

Para realizar los ensayos de transmisión, se utilizaron plantas de *Cantharanthus roseus* L. (vinca rosea o vinca) obtenidas a partir de semillas. Se realizaron análisis moleculares de nested PCR tanto a las semillas como a las plantas germinadas para confirmar que estuviesen libres de fitoplasmas. Se utilizaron 3 plantas de vinca por prueba de transmisión, donde cada prueba de transmisión correspondía a una fecha de captura. En total se utilizaron 45 plantas durante los 8 meses de muestreo, correspondientes a 14 capturas. Como control negativo, se utilizaron 3 plantas libres de fitoplasmas y nunca expuestas a la presencia de los insectos.

La obtención de plantas de vincas se realizó en almácigo, trasplantando a recipientes plásticos (250cc) a la cuarta hoja verdadera. Para el sustrato se utilizó una mezcla basada en tres medidas de turba y dos de perlita, luego se esterilizó en autoclave de vapor a 1,5 kgf/cm² de presión por 30 minutos, para eliminar la presencia de patógenos que podrían afectar el desarrollo de las plantas. Para las pruebas de transmisión se utilizaron plantas en estado herbáceo de 10 a 12 cm de altura (Fig. 3).



Figura 3. Planta de vinca utilizada en las pruebas de transmisión.

Las jaulas entomológicas utilizadas en este trabajo poseían un tamaño de 50cm x 40cm x 50cm. Sus paredes estaban constituidas por malla antiáfido con una apertura, protegida por tul, que permitía el ingreso de las plantas y los insectos y evitaba el escape de estos últimos una vez iniciada la prueba de transmisión (Fig. 4).



Figura 4. Jaula entomológica

Los individuos adultos de *B. valdiviana* fueron colocados en una jaula entomológica con tres plantas de vinca, cada una identificada con un código. Éstas se mantuvieron bajo condiciones de invernadero a 25°C con 16 horas de luz y 8 de oscuridad, de manera de asegurar que los insectos se alimenten de las plantas indicadoras.

A medida que los insectos morían, se retiraban de la jaula para luego depositarlos, por separado, en tubos eppendorf con alcohol al 70%. Se registró el número de días durante los cuales cada insecto se alimentó. Cada tubo se identificó con el código correspondiente a la prueba de transmisión respectiva y se colocó a 4°C.

Una vez que todos los insectos murieron, las plantas también fueron retirada de las jaulas y tratadas con insecticidas. Se mantuvieron en invernadero a temperatura ambiente a la espera de la manifestación de síntomas. Las plantas fueron analizadas a los 8 y 10 meses posteriores a la prueba de transmisión, dependiendo la expresión de síntomas, sin embargo a los 14 meses fueron analizadas todas las plantas.

Caracterización molecular de fitoplasmas en vincas y langostinos

Extracción de DNA total

La extracción de DNA se realizó mediante el protocolo modificado propuesto por Zhang *et al.* (1998), el cual se describe a continuación para plantas e insectos.

La extracción de DNA de las plantas se realizó desde nervaduras. En un mortero estéril, se colocó 1 g de tejido y se molió con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. Posteriormente, se adicionó 8 mL de Grinding buffer (100 mM de K₂HPO₄, 30 mM de KH₂PO₄, 10% de sacarosa, 2% de PVP, 0,15 % de BSA fracción V y 30 mM de ácido ascórbico) y se transfirió a un tubo de 15 mL. El macerado se centrifugó por 30 minutos a 12000 g a 4°C y el sobrenadante se eliminó. Al precipitado se le agregó 4 mL de buffer de extracción (0,1 M de Tris – HCl 1M pH 8.0, 50mM de EDTA 0,5M pH 8.0 y 0,5 M de NaCl), 80 mL de proteinasa K (5mg/mL) y 440 µL de N lauryl-saucosil al 10 %, mezclándose por inversión. Luego los tubos se incubaron a 55°C por 120 minutos, terminada la incubación se centrifugó por 10 minutos a 7500g a 4°C. El sobrenadante se transfirió a un tubo que contenía 2,5 mL de isopropanol (0,6 v/v) y se dejó incubar a -20°C por 30 minutos. Luego se centrifugó por 15 minutos a 7500g a 4°C y se eliminó el sobrenadante. El precipitado se resuspendió con 3 mL de buffer TE 1X (10 mM de Tris - HCl 1M pH 8.0 y 1 mM de EDTA 0,5M pH 8.0), 60 µL de proteinasa K (5mg/ml) y 75 µL de SDS al 20 % y se mezcló por inversión e incubó a 37°C por 1 hora. Tras la incubación, se añadió 525 µl de NaCl 5M y 420 µl de CTAB/ NaCl (CTAB al 10% y 0,7M de NaCl), nuevamente se mezcló e incubó a 65°C por 10 minutos. Una vez concluida la incubación, se agregó 2 mL de cloroformo: alcohol isoamilico 24:1 y 2 mL de fenol saturado en TE 1X pH8, se agitó vigorosamente y se centrifugó por 10 minutos a 6500g a 4°C. La fase

superior se transfirió a un tubo con 2,5 mL isopropanol (0,6 v/v), se mezcló por inversión y se dejó a 4°C toda la noche.

Al día siguiente, se centrifugó por 30 minutos a 12000g a 4°C y se descartó el sobrenadante con cuidado. El precipitado de DNA fue lavado con 1 mL de etanol al 70% frío. Posteriormente se centrifugó por 10 minutos a 12000g a 4°C y se eliminó el sobrenadante. Los tubos se dejaron secar hasta evaporarse todo el alcohol etílico.

Finalmente, el DNA se resuspendió en 50 a 200 µL de buffer TE 1X pH8.0 y se traspasó a tubos de 0,6 ml, guardándose a 4°C las muestras. El DNA se cuantificó con espectrofotómetro, de manera de verificar la calidad del material genético extraído.

La extracción de DNA a partir de individuos adultos de *B. valdiviana*, se realizó por grupos de 5 insectos del mismo sexo, todos procedentes de un mismo ensayo de transmisión. Se rotularon cuidando separar los machos de las hembras.

Los individuos se colocaron en tubos de 1,5 mL, se molieron con el uso de pistilos estériles y con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. Luego se agregó 200 µL de buffer de extracción (3 % de CTAB, 0,2 % de 2-β mercaptoetanol, 1,4 M de NaCl, 10mM de EDTA 0,5 M pH 8.0 y 0,1M Tris-HCl 1M pH 8.0) y se incubó por 30 minutos a 65°C. Posteriormente, se agregó 200 µL de cloroformo: alcohol isoamílico 24:1 y se agitó vigorosamente. Los tubos se centrifugaron durante 10 minutos a 11000 rpm a 4°C. El sobrenadante se transfirió a un tubo con 200 µL de isopropanol, se mezcló y se llevó a incubar por 5 minutos a -20°C. Luego de 15 minutos de centrifugación a 11000 rpm a 4°C se eliminó el sobrenadante. Se agregó 100 µL de solución de NaCl 1,2M y 100 µL de solución de cloroformo/alcohol isoamílico 24:1 y se mezcló vigorosamente. Se centrifugó los tubos a 11000 rpm por 10 minutos a 4°C. Se transfirió el sobrenadante a un set de tubos y se les adicionó 100 µL de isopropanol frío mezclándose vigorosamente para luego centrifugar los tubos a 11000 rpm por 10 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se lavó el precipitado de DNA con 100 µL de solución de alcohol etílico 70% frío. Se centrifugó a 11000 rpm por 5 minutos a 4°C y se eliminó el sobrenadante. Los tubos se dejaron secar hasta la completa evaporación del alcohol etílico. Finalmente, se resuspendió el precipitado de DNA con 40 a 60 µL de buffer TE 1X pH 8.0, y se transfirió a tubos de 0,6 mL, guardándose a -20°C.

Detección de fitoplasmas por nested PCR.

Para la detección de los fitoplasmas en plantas e insectos se utilizó la técnica definida nested PCR (PCR anidada), que consiste en un primer PCR con partidores universales, cuyo producto de amplificación se somete a un segundo PCR con otra pareja de partidores universales, para aumentar la sensibilidad de la técnica (Gundersen y Lee, 1996). Los partidores utilizados en este estudio amplifican regiones del genoma de las fitoplasma correspondiente al gen 16S rRNA.

Gen 16S rRNA

La amplificación del gen 16S rRNA se realizó a través de PCR según el protocolo de Schaff *et al.* (1992). En la detección de fitoplasmas, se utilizaron en el PCR directo los partidores universales P1/P7 que amplifican 1819 pb. Luego, se realizó el nested PCR, previo dilución de 1:20 del producto de amplificación del PCR anterior; para el nested PCR se usaron los partidores universales R16F2n/R2 que amplifican aproximadamente 1250 pb (Cuadro 1).

Cuadro 1. Partidores universales para nested PCR en el gen 16S rRNA.

Partidores	Secuencia partidores (5' - 3')	Cita bibliográfica
P1	AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT	Deng and Hiruki, 1991
P7	CGTCCTTCATCGGCTCTT	Smart <i>et al.</i> , 1996
R16F2n	GAAACGACTGCTAAGACTGG	Gundersen and Lee, 1996
R16R2	TGACGGGCGGTGTGTACAAACCCCG	Gundersen and Lee, 1996

Cada reacción de PCR se realizó utilizando un volumen final de 30 μ L con los siguientes componentes: 2 μ L de DNA templado (20 ng/ μ L), 0,4 μ L de cada partidor (nmol/ μ L), 3 μ L de buffer PCR (10X), 0,9 μ L de MgCl₂ (50 μ M), 0,6 μ L de dNTP's (10 μ M) 22, 5 μ L de agua ultra estéril y 0,2 μ L de enzima Taq polimerasa Platinum (Invitrogen). Estas reacciones se llevaron a cabo en un termociclador (Techne TC 3000 6) con incubación de 1 minuto a 94°C, seguida de 35 ciclos que consistió en las siguientes etapas: desnaturalización de 1 minuto a 94°C; apareamiento de los partidores por 45 segundos a 53°C (55°C desde el segundo ciclo); elongación de 90 segundos a 72°C. La extensión final fue de 72°C durante 7 minutos seguida por una reducción de la temperatura a 4°C por un tiempo indefinido para enfriamiento y conservación de las moléculas de DNA sintetizadas.

Para la reacción de nested PCR se utilizó el mismo procedimiento, utilizando los partidores apropiados y modificando la temperatura de apareamiento a 55°C.

En todas las reacción de PCR que se realizó para el gen 16S rRNA, se utilizó como control positivo extracto de DNA de fitoplasma del subgrupo ribosomal 16SrI-F (Ash yellows, A-AY) mantenido en vinca *in vitro* en la colección del laboratorio de Fitovirología, Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile. Como control negativo se utilizaron las plantas de vinca que no estuvieron en contacto con los insectos.

Electroforesis

Los productos de amplificación procedentes de los nested PCR del gen 16S rRNA, se separaron a través de electroforesis en gel de agarosa al 1,2%, utilizando buffer TAE 1X

(Tris 40 mM, 20 mM de ácido acético y EDTA 1 mM, pH 8,0). Los geles se tiñeron con bromuro de etidio. La electroforesis se realizó utilizando una fuente de poder (EPS – 300 IIV) a 110 voltios durante 30 minutos. Los productos de amplificación se visualizaron a través de un transiluminador de luz UV y se fotografiaron utilizando el equipo de fotodocumentación de luz UV. Para la determinación del tamaño de los fragmentos amplificados se utilizó 6 μ L de DNA ladder 100 bps (Invitrogen).

Las bandas de DNA positivas amplificadas en los nested PCR se cortaron del gel de agarosa para su purificación siguiendo el protocolo comercial E.Z.N.A Kit (Omega Biotek).

Ligación de los productos de PCR en el vector de clonación

Los fragmentos de 1.250 pb de fitoplasmas amplificados por nested PCR y posteriormente purificados, fueron ligados en el vector de clonación pGEM-T Easy Vector System I (Promega).

La reacción de ligación fue realizada de la siguiente manera: se mezclaron 3 μ L de DNA purificado, 1 μ L del vector (25ng/ μ L), 5 μ L de buffer de clonación (2X) y 1 μ L de T4 DNA ligasa (3U/ μ L), en un volumen total de reacción de 10 μ L. Posteriormente, la reacción se incubó a 4°C durante toda la noche. Después de este proceso, el producto de la ligación estuvo listo para ser trasferido a las células competentes de la bacteria *Escherichia coli*.

Transformación de las células competentes

A continuación se realizó el proceso de transformación, a través del cual el vector que contiene el fragmento de DNA se inserta en las células competentes de *E. coli* Top 10 ® (Invitrogen).

En un microtubo de 1,5 mL se colocaron de 10 μ L de la reacción de ligación y 100 μ L de células competentes; todo se mantuvo en hielo por 10 minutos. Luego se procedió al choque térmico, por incubación a 42°C por 2 minutos. Se volvieron a colocar los microtubos en hielo por 2 minutos. Luego, se agregaron 400 μ L de medio líquido de LB (1% de triptona, 0,5 % de extracto de levadura, 0,25 % de NaCl) a los microtubos que contenían las células transformadas. Los microtubos se incubaron a 37°C por 1 hora en agitación para promover el crecimiento de las células transformadas. Posteriormente, se centrifugaron los microtubos a 3000 rpm por 2 minutos para obtener un concentrado de células y se descartó aproximadamente 450 μ L del sobrenadante. Luego, se resuspendió el “pellet” en el resto del sobrenadante (aproximadamente 50 μ L). Bajo campana de flujo laminar, se sembraron 20 μ L de la reacción de transformación en placas Petri con medio LB 4% de agar, carbenicilina (100mg/mL), IPTG (100mg/mL) (isopropinil- β -D tiogalactopiranosida) y X-Gal (20ng/mL) (5-bromo-4-cloro-3indol- β -D galactopiranisida) y se incubaron por 16 horas a 37°C. Al final del periodo de incubación fue posible diferenciar entre las células transformadas de aquellas no transformadas, a través de la coloración que presentan las colonias. Las células transformadas presentaron colonias de color blanco.

Esto sucede cuando las colonias recombinantes han incorporado el plasmidio con el fragmento de DNA: la inserción interrumpe el marco de lectura de la β -galactosidasa haciéndola no funcional. Por lo tanto es incapaz de emplear el sustrato XGal para producir la coloración azul que aparece en las colonias formadas a partir de una célula no transformadas.

Para confirmar la presencia del inserto, se realizó un PCR utilizando la pareja de partidores SP6/T7 que flanquean la zona de inserto en el plasmidio. Los productos de amplificación obtenidos por PCR se purifican desde gel de agarosa siguiendo el protocolo comercial E.Z.N.A Kit (Omega Biotek).

Obtención de secuencias

El DNA clonado se envió a Macrogen Corp (USA) para su secuenciación.

Identificación molecular

Las secuencias se editaron y alinearon utilizando los programas BioEdit and CLUSTAL X2 (Thompson *et al.*, 1997; Hall, 1999); el análisis filogenético se realizó utilizando el método de “Minimum Evolution” de MEGA, versión 4.0 (Tamura *et al.*, 2007), para comparar las secuencias nucleotídicas obtenidas con aquellas de fitoplasmas publicadas en el National Center for Biotechnology Information (NCBI) disponible en internet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>).

Para completar la identificación se recurrió al análisis del polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) *in silico*. Las secuencias nucleotídicas correspondientes al gen 16S rRNA de los fitoplasmas encontrados durante este estudio, tanto en vinca como en insectos, fueron alineadas con referencia depositadas en Genbank y Q-Bank. A través del programa Vector NYT se realizó una digestión virtual con enzimas propuestas por Zhao *et al.* (2009). Estas enzimas fueron *HhaI*, *BstUI* y *RsaI*, para el gen 16S rRNA. La digestión *in silico* generó una imagen simulada de electroforesis en gel de poliacrilamida al 6%. Esta imagen revela los perfiles correspondientes a los fitoplasmas del grupo 16SrIII.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Colecta de insectos

Durante las catorce jornadas de captura (octubre de 2012 a junio 2013) se colectaron 263 individuos adultos de *B. valdiviana*, 110 insectos resultaron machos (42%) y 153 (58%) hembras. En el Cuadro 2 es posible apreciar en detalle el número de insectos por fecha de captura.

Cuadro 2. Numero de individuos de *B. valdiviana* capturados

Jornada de captura	Fecha	Nº de Insectos
1	26/10/2012	3
2	19/11/2012	9
3	15/12/2012	12
4	03/01/2013	14
5	26/01/2013	12
6	15/02/2013	15
7	03/03/2013	16
8	24/03/2013	18
9	10/04/2013	20
10	23/04/2013	23
11	06/05/2013	25
12	22/05/2013	28
13	07/06/2013	32
14	25/06/2013	36
Total		263

El número de insectos colectados fue aumentando a medida que avanzaba la temporada (Fig. 5), por lo que el índice de abundancia relativa (número de insectos de *B. valdiviana* en relación a otros cicadélidos), también fue en aumento (Fig. 6). Lo anterior puede estar asociado directamente a la disponibilidad de alimento para estos insectos, ya que *B. valdiviana* vive en asociación con malezas, principalmente con correhuela (*Convolvulus arvensis* L.) y sanguinaria (*Polygonum aviculare* L.) durante el verano y diversos tipos de gramíneas en otoño, época en la cual se registra una mayor colecta de insectos.

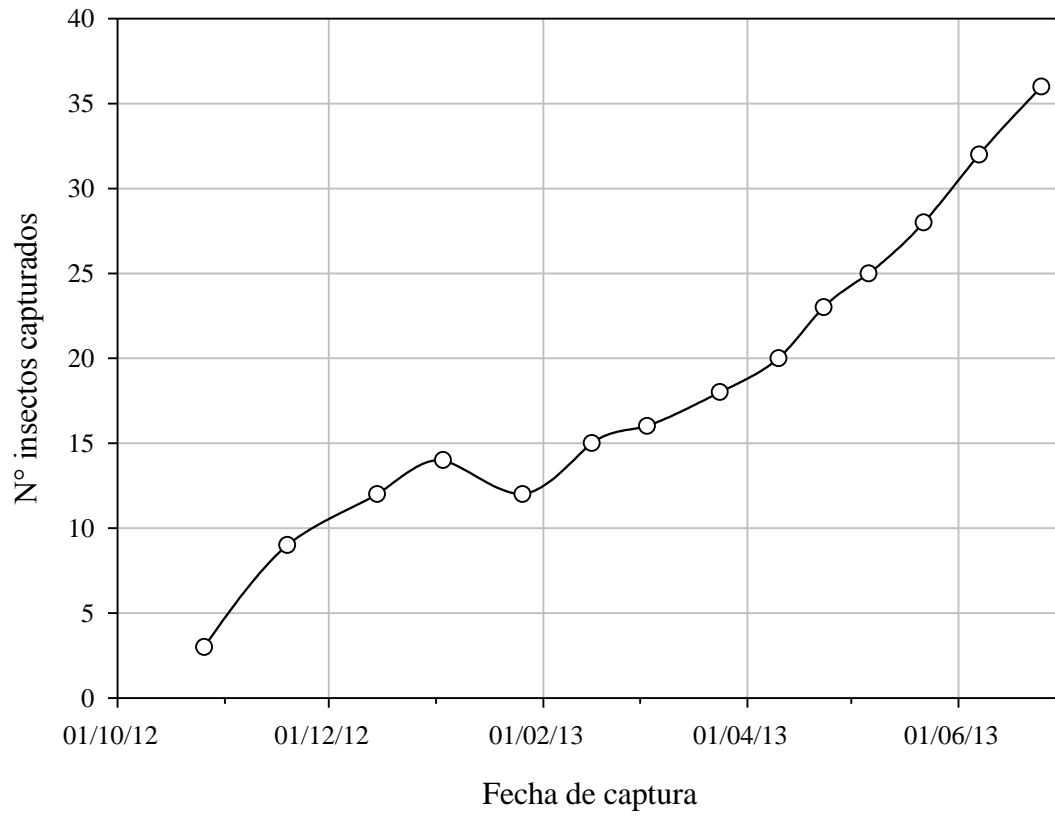


Figura 5. Cantidad de insectos totales capturados.

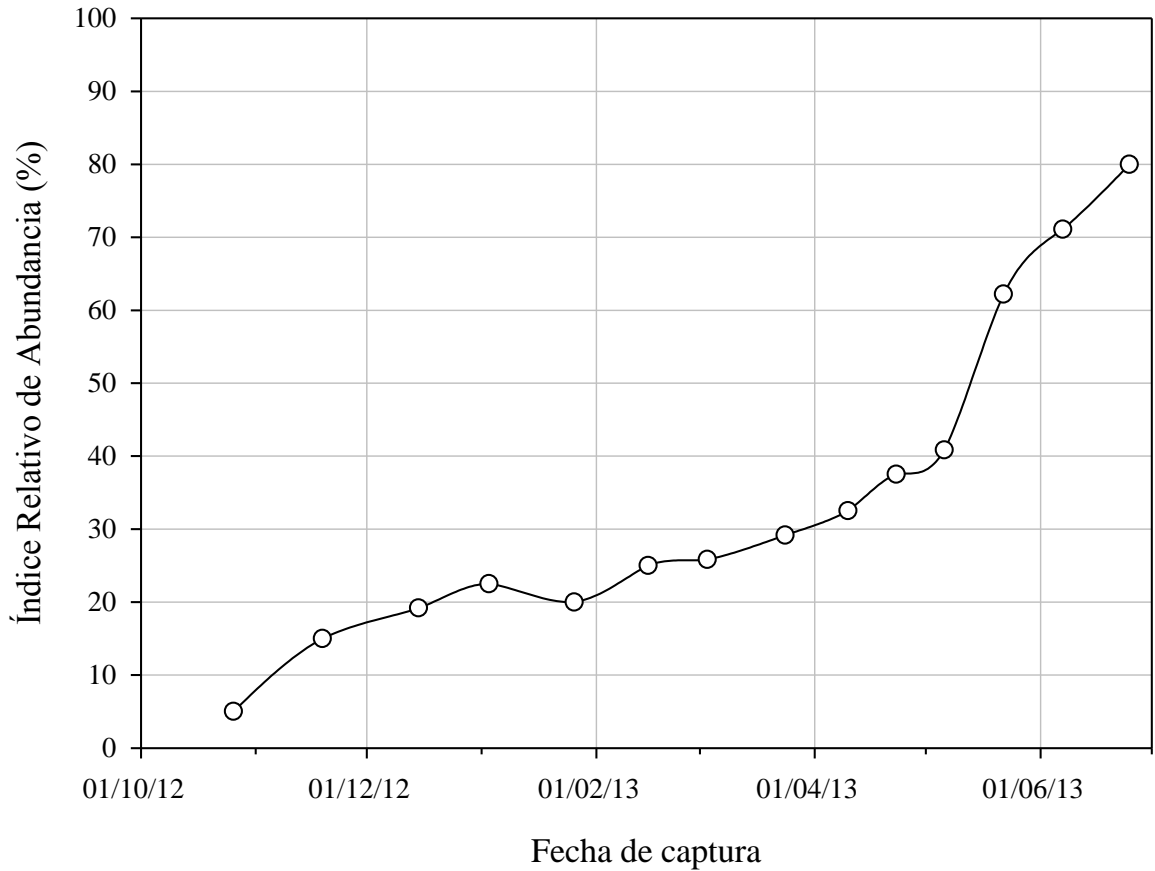


Figura 6. Abundancia relativa de *B. valdiviana* durante el periodo de colecta.

Pruebas de transmisión

Se realizaron 14 ensayos de transmisión, cada uno correspondiente a un día de captura de insectos. Para cada ensayo se utilizaron tres plantas de vinca, por un total de 42 plantas (3 plantas x 14 ensayos). Otras tres vincas se utilizaron como control negativo, o sea sin haber estado en contacto con los insectos.

Un pequeño porcentaje de los individuos de *B. valdiviana* colectados murieron antes de colocarlos en las jaulas entomológicas por lo que el número de individuos colectados difiere a los insectos utilizados en las pruebas transmisión (Cuadro 3).

Cuadro 3. Números de individuos de *B. valdiviana* colocados en cada jaula para las pruebas de transmisión.

Prueba de transmisión	Nº de individuos capturados	Nº de individuos utilizados en las pruebas de transmisión	Código Plantas*
1	3	3	52A - 52B - 52C
2	9	8	53A - 53B - 53C
3	12	12	54A - 54B - 54C
4	14	14	55A - 55B - 55C
5	12	12	56A - 56B - 56C
6	15	13	57A - 57B - 57C
7	16	15	58A - 58B - 58C
8	18	17	59A - 59B - 59C
9	20	19	60A - 60B - 60C
10	23	23	61A - 61B - 61C
11	25	24	62A - 62B - 62C
12	28	27	63A - 63B - 63C
13	32	30	64A - 64B - 64C
14	36	34	65A - 65B - 65C
Total	263	251	42

*Códigos asignados a las plantas utilizadas para cada una de las pruebas de transmisión.

En cuanto a la sobrevivencia de los individuos adultos de *B. valdiviana* en las pruebas de transmisión, esta fue de hasta 15 días, con un promedio de 6 días. Sin embargo, durante los primeros cuatro días de prueba de transmisión se observó la muerte de aproximadamente el 50% de los individuos (Fig. 7).

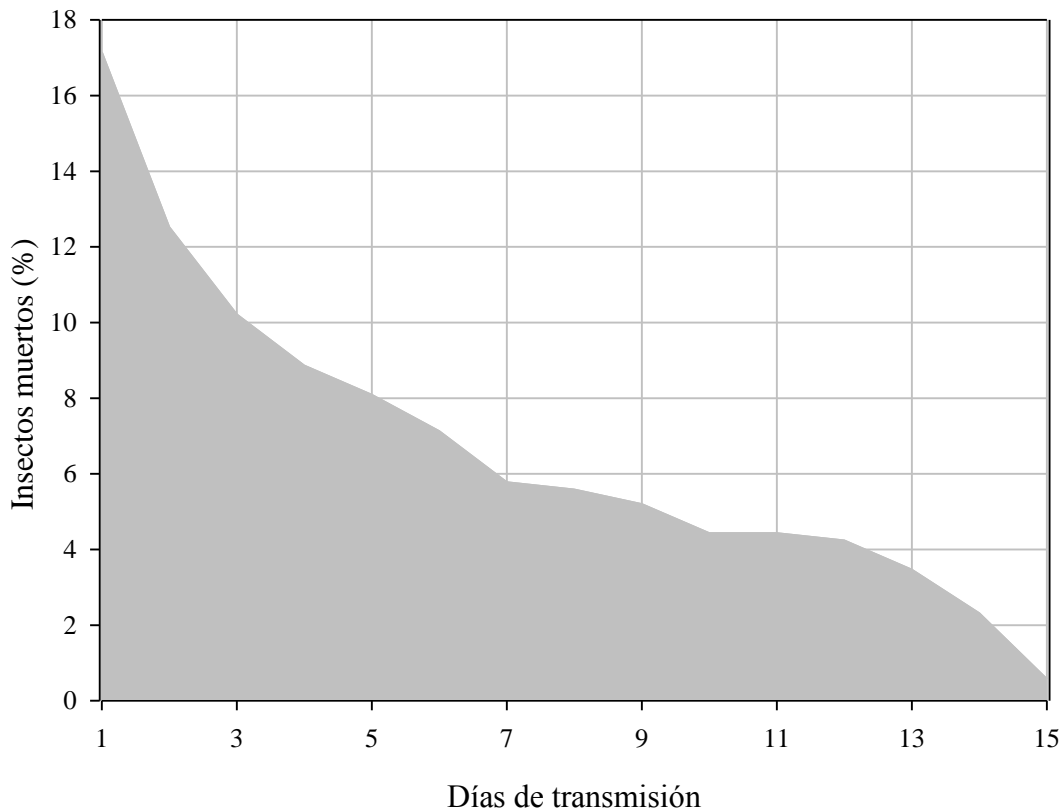


Figura 7. Distribución promedio de la sobrevivencia de *B. valdiviana* en las pruebas de transmisión.

Detección de fitoplasmas por nested PCR

Las 42 plantas de vinca utilizadas en las pruebas de transmisión se analizaron para el gen 16S rRNA con los partidores P1/P7 y en nested PCR con R16F2n/R2, amplificando un fragmento de 1250 pb. Para cada planta positiva a fitoplasmas, todos los insectos puestos en contacto con esta, se analizaron utilizando la misma técnica. Las plantas utilizadas como controles, resultaron negativas a fitoplasmas.

Todas las plantas fueron analizadas 2 veces, a los 10 y 14 meses posteriores al término de la prueba de transmisión. Dos plantas de vinca, rotuladas con los códigos 62B y 64A, resultaron positivas a fitoplasmas a través del estudio del gen 16S rRNA, la primera fue detectada a los 10 meses posterior a la prueba de transmisión, la segunda fue detectada a los 14 meses.

El porcentaje de transmisión resultó ser 4,76 %. Los insectos introducidos en las jaulas en las cuales estaban las plantas 62B y 64A, fueron analizados en grupos de 5 individuos,

resultando positivos un grupo de insectos por cada prueba de transmisión, 3M correspondiente a la vinca 62B y 3Y correspondiente a la vinca 64A (Figura 8).

Los insectos del resto de las pruebas de transmisión fueron analizados de igual manera, resultando un 58% de positivos, lo que nos indica que las pruebas fallaron debido a que el insecto no logró alimentarse de las plantas de vinca o, más verosímilmente, se encontraba en periodo de latencia por lo que no pudo transmitir el fitoplasma.

Los bajos porcentajes de transmisión obtenidos durante este estudio, no deben inducirnos a minimizar la importancia de los fitoplasma; Hanboonsong *et al.* (2006) mencionan que el porcentaje de transmisión de fitoplasmas en las plantas utilizadas en pruebas de transmisión, normalmente es baja; Maixner *et al.* (2000) informaron que *Oncopsis alni* (Schrank) ha logrado transmitir el fitoplasma "alder yellows" (16SrV-C) a vid con un éxito del 3,5% (3 de 88 plantas utilizadas en transmisión); el 2% (1 de 50 plantas usadas en transmisión) de plantas de duraznero resultaron infectadas por el 'Candidatus Phytoplasma prunorum' transmitidos a través *Cacopsylla pruni* (Scopoli) (Jarausch *et al.*, 2001).

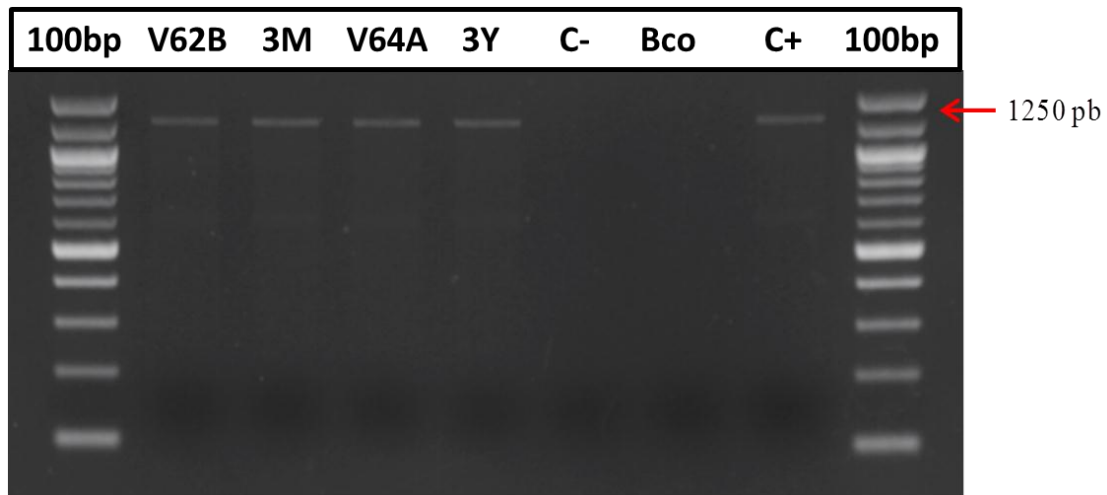


Figura 8. Nested PCR con los partidores R16F2n/R2 (gen 16S rRNA) de plantas de vinca e insectos *B. valdiviana* en las pruebas de transmisión. 100bp: marcador de peso molecular 100 pb; V62B: planta de vinca infectada por fitoplasma correspondiente a la prueba de transmisión ocurrida en abril; 3M: Insectos macho correspondientes a la prueba de transmisión con la planta V62B; V64A: planta de vinca infectada por fitoplasma correspondiente a la prueba de transmisión ocurrida en junio; 3Y: Insectos hembra correspondientes a la prueba de transmisión con la planta V64A; C-: Control negativo; Bco: Blanco de PCR; C+: Control positivo.

Las plantas positivas corresponden a las pruebas de transmisión efectuadas en Mayo y Junio, lo cual podría explicarse por el mayor número de insectos puestos en contacto con las plantas, así como también a una mayor acumulación del fitoplasma en las plantas herbáceas reservorio en las cuales se alimentaban los insectos en terreno.

Los insectos correspondientes a las pruebas de transmisión fueron analizados en grupos definidos por el sexo y días de sobrevivencia. Resultando positivos los machos que sobrevivieron 7-8 días, correspondientes a la prueba de transmisión realizada en mayo, y las hembras que sobrevivieron 4-6 días, correspondientes a la prueba de transmisión efectuada en Junio. Por lo que los machos como las hembras se demostraron eficientes en la transmisión del fitoplasma 16SrIII-J.

Caracterización de fitoplasmas por análisis de secuencia y RFLP *in silico*

La caracterización de los fitoplasmas se llevó a cabo mediante la secuenciación de los productos de amplificación del PCR realizado al gen 16S rRNA previamente clonados a partir de las muestras positivas de vinca y *B. valdiviana*. Las secuencias nucleotídicas obtenidas se alinearon y compararon con secuencias de fitoplasmas publicadas en GenBank (NCBI) y Q-Bank.

Cabe señalar que por cada muestra se rescataron 5 clones los cuales se secuenciaron. Las secuencias obtenidas de cada clon referente a una misma muestra fueron idénticas entre sí (100% de identidad nucleotídica).

Los porcentajes de similitud entre las secuencias nucleotídicas de los fitoplasmas detectados en vincas e insectos utilizados en las pruebas de transmisión, indicaron una estrecha correlación (entre un 98,9% y un 99,8%) con los aislados de referencia del grupo ribosomal 16SrIII (Cuadro 4).

Los aislados correspondientes a las vincas positivas (62B y 64A) y a un grupo de insectos positivos (3M) se sometieron a un análisis a través de un RFLP *in silico*, utilizando las enzimas *HhaI*, *BstUI* y *RsaI*. Los perfiles de digestión virtual con la enzima *HhaI* (Fig. 9), muestran que los aislados de vinca e insecto son idénticos a los perfiles de los aislados PB1, GR1, MW1, Ch10, PPT-MT117-1, PPT-AK6 y BRWB7 (Cuadro 4). Luego, para continuar con la identificación de los aislados chilenos, se realizó una segunda digestión virtual con la enzima *BstUI* que generó perfiles idénticos a los aislados Ch10 y BRWB7 (Fig. 10). Finalmente, se realizó una tercera digestión virtual con la enzima *RsaI* confirmando que los aislados de vinca y *B. valdiviana* poseen el mismo perfil de restricción del aislado Ch10, fitoplasma perteneciente al subgrupo ribosomal 16SrIII-J (Fig. 11), correspondiente al fitoplasma “escoba de bruja del chayote” de Brasil (Montano *et al.*, 2000), que también posee el mayor porcentaje de identidad con los fitoplasmas detectados en las dos plantas de vinca y en *B. valdiviana* (Cuadro 4).

El fitoplasma perteneciente al subgrupo ribosomal 16SrIII-J, ha sido reportado en Chile en cerezo con decaimiento (Fiore *et al.*, 2011). También en la vid, ocasionando amarilleces (Fiore *et al.*, 2010) y en la remolacha causando la enfermedad denominada marchitez amarilla de la remolacha (Fiore *et al.*, 2015). Además se ha descrito en *Galega officinalis* L., maleza asociada a varios cultivos en Chile (Fiore *et al.*, 2015). Finalmente, ha sido demostrado que el fitoplasma 16SrIII-J es transmitido en Chile también por el cicadélido *P. exitiosus* (Fiore *et al.*, 2012).

Con este estudio se amplían los conocimientos acerca de la epidemiología de fitoplasmas en Chile. En específico, hoy podemos prevenir la diseminación del fitoplasma 16SrIII-J en la vid, propagando material vegetal sano, controlando los insectos vectores *P. exitiosus* y *B. valdiviana* y eliminando la malezas reservorio del fitoplasma, ya que aunque estos insectos se alimentan principalmente de ellas, cuando éstas se eliminan o mueren, el insecto puede visitar casualmente plantas de vid u otro cultivo para alimentarse y así transmitir el fitoplasma. Por lo tanto, la alta prevalencia del insecto, favorecería notablemente la dispersión del fitoplasma 16SrIII-J en Chile.

Cuadro 4. Porcentaje de identidad de las secuencias nucleotídicas entre los aislados de vinca y *B.valdiviana* (gen 16S rRNA) y los registrados en GenBank.

Aislado	Código de secuencia	N° GenBank	Subgrupo ribosomal	% identidad
Peach X-disease phytoplasma	CX	L33733	16SrIII-A	99,1
Clover yellow edge phytoplasma	CYE-C	AF175304	16SrIII-B	99,4
Pecan bunch phytoplasma	PB1	FJ376626	16SrIII-C	99,3
Goldenrod yellows phytoplasma	GR1	FJ376627	16SrIII-D	99,5
Spiraea stunt phytoplasma	SP1	AF190228	16SrIII-E	99,3
Milkweed yellows phytoplasma	MW1	AF510724	16SrIII-F	99,5
Walnut witches' broom phytoplasma	WWB	AF190226	16SrIII-G	99,3
Poinsettia branch-inducing phytoplasma	PoiBI	AF190223	16SrIII-H	99,3
Virginia grapevine yellows phytoplasma	VGyIII	AF060875	16SrIII-I	99,3
Chayote witches' broom phytoplasma	ChWBIII (Ch10)	AF147706	16SrIII-J	99,8
Strawberry leafy fruit phytoplasma	SLF	AF274876	16SrIII-K	99,5
Poinsettia exuberant flowerinducing phytoplasma	EF-MM	EU169138	16SrIII-L	99,6
Montana potato purple top phytoplasma	PPTMT117-1	FJ226074	16SrIII-M	99,2
Alaska potato purple top phytoplasma	PPT-AK6	FJ376629	16SrIII-N	99,0
Dandelion virescence phytoplasma	DanVir	AF370120	16SrIII-O	99,4
Dandelion virescence phytoplasma	DanVir	AF370119	16SrIII-P	99,2
Black raspberry witches' broom phytoplasma	BRWB7	AF302841	16SrIII-Q	99,6
Cirsium white leaf phytoplasma	CirWL	AF373105	16SrIII-R	99,3
Western peach X-disease phytoplasma	WX	L04682	16SrIII-S	98,9

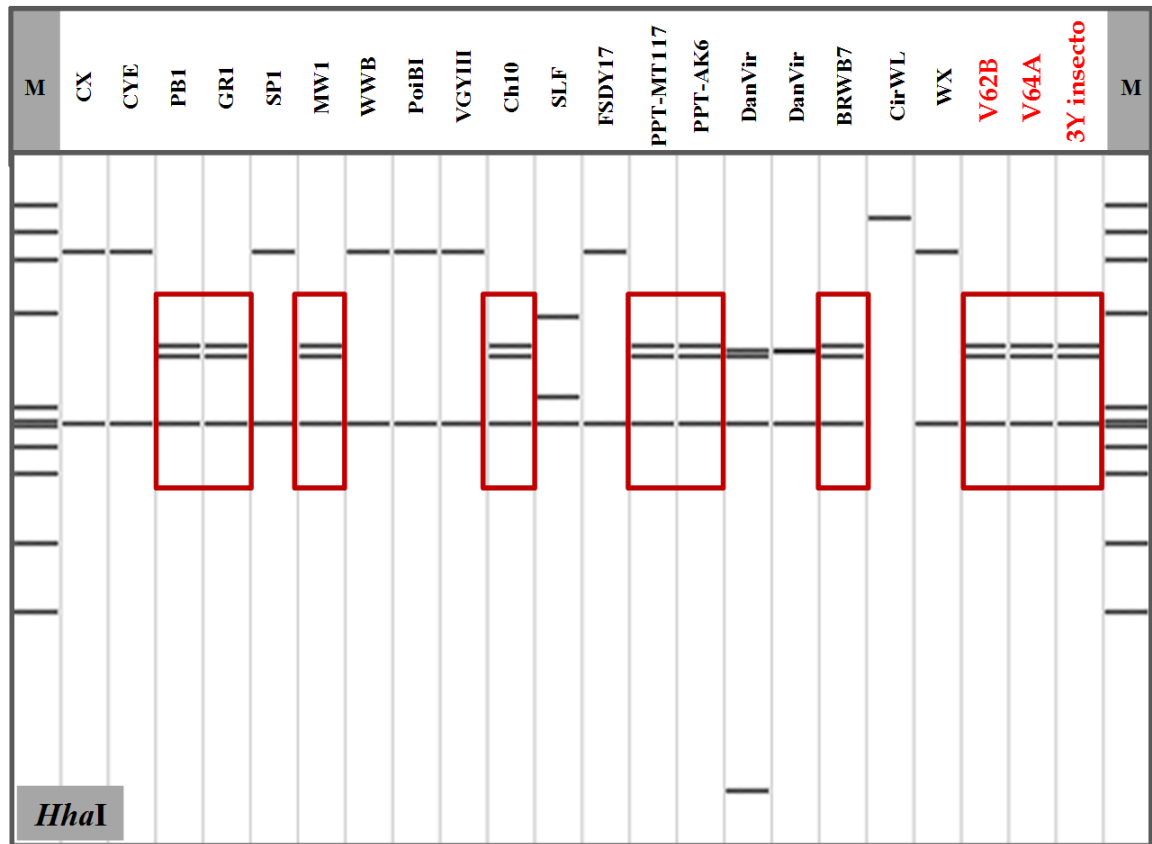


Figura 9. Perfiles de RFLP *in silico* digeridos con la enzima *HhaI* de las secuencias de los fragmentos amplificados en nested PCR con R16F2n/R2 del gen 16S rRNA de aislados de planta de vinca y *B. valdiviana* provenientes de pruebas de transmisión. Fitoplasmas de referencias al grupo ribosomal 16SrIII: CX (16SrIII-A), CYE (16SrIII-B), PB1 (16SrIII-C), GR1 (16SrIII-D), SP1 (16SrIII-E), MW1 (16SrIII-F), WWB (16SrIII-G), PoiBI (16SrIII-H), VGYIII (16SrIII-I), Ch10 (16SrIII-J), SLF (16SrIII-K), FSDY17 (16SrIII-L), PPT-MT117-1(16SrIII-M), PPT-AK6 (16SrIII-N), Dan Vir (16SrIII-O), Dan Vir (16SrIII-P), BRWB7 (16SrIII-Q), CirWL (16SrIII-R) y WX (16SrIII-S) (Cuadro 7). Vc 62B: aislado de vinca correspondiente a la prueba de transmisión realizada en abril. Vc 64A: aislado de vinca correspondiente a la prueba de transmisión realizada en junio. I3Y: aislado representativo de *B. valdiviana*. M: marcador molecular PhiX174.

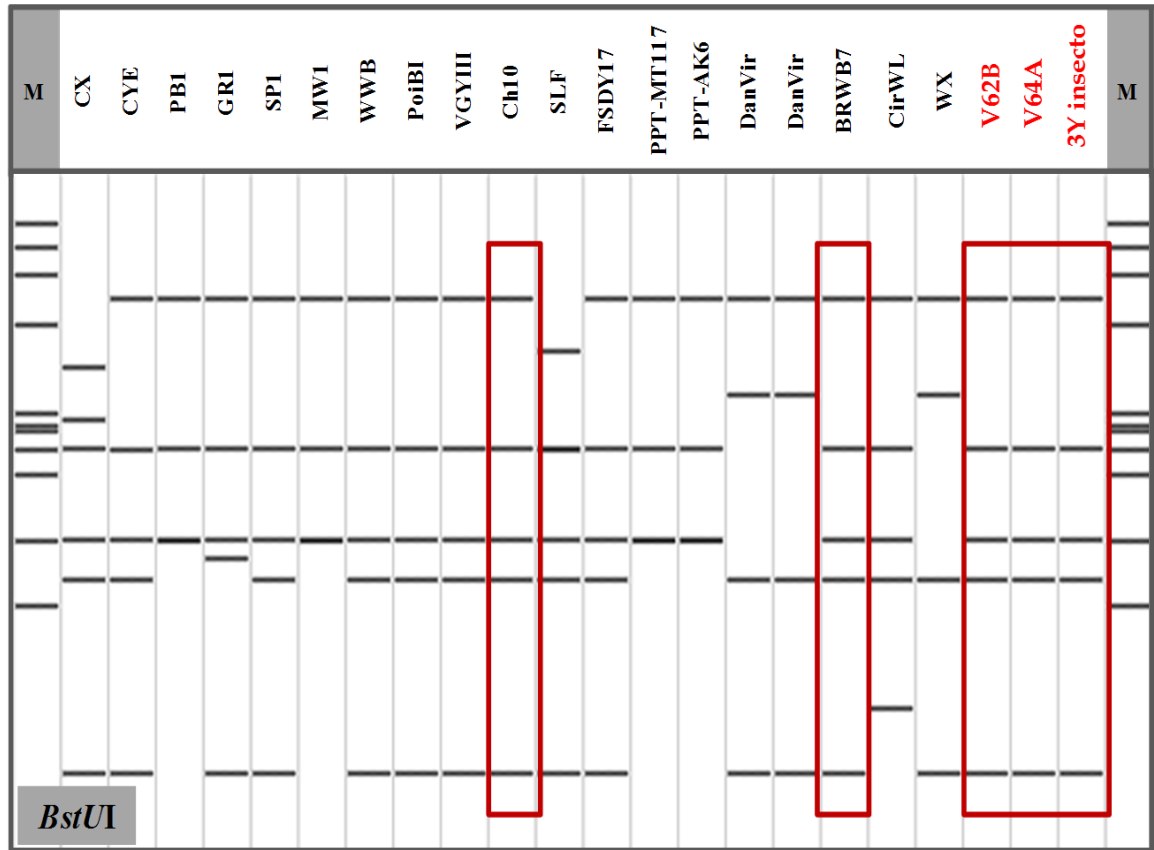


Figura 10. Perfiles de RFLP *in silico* digeridos con la enzima *BstUI* de las secuencias de los fragmentos amplificadas en nested PCR con R16F2n/R2 del gen 16S rRNA de aislados de planta de vinca y *B. valdiviana* provenientes de pruebas de transmisión. Fitoplasmas de referencias al grupo ribosomal 16SrIII: CX (16SrIII-A), CYE (16SrIIIB), PB1 (16SrIII-C), GR1 (16SrIII-D), SP1 (16SrIII-E), MW1 (16SrIII-F), WWB (16SrIII-G), PoiBI (16SrIII-H), VGYIII (16SrIII-I), Ch10 (16SrIII-J), SLF (16SrIII-K), FSDY17 (16SrIII-L), PPT-MT117-1 (16SrIII-M), PPT-AK6 (16SrIII-N), Dan Vir (16SrIII-O), Dan Vir (16SrIII-P), BRWB7 (16SrIII-Q), CirWL (16SrIII-R) y WX (16SrIII-S) (Cuadro 7). Vc 62B: aislado de vinca correspondiente a la prueba de transmisión realizada en abril. Vc 64A: aislado de vinca correspondiente a la prueba de transmisión realizada en junio. I3Y: aislado representativo de *B. valdiviana*. M: marcador molecular PhiX174.

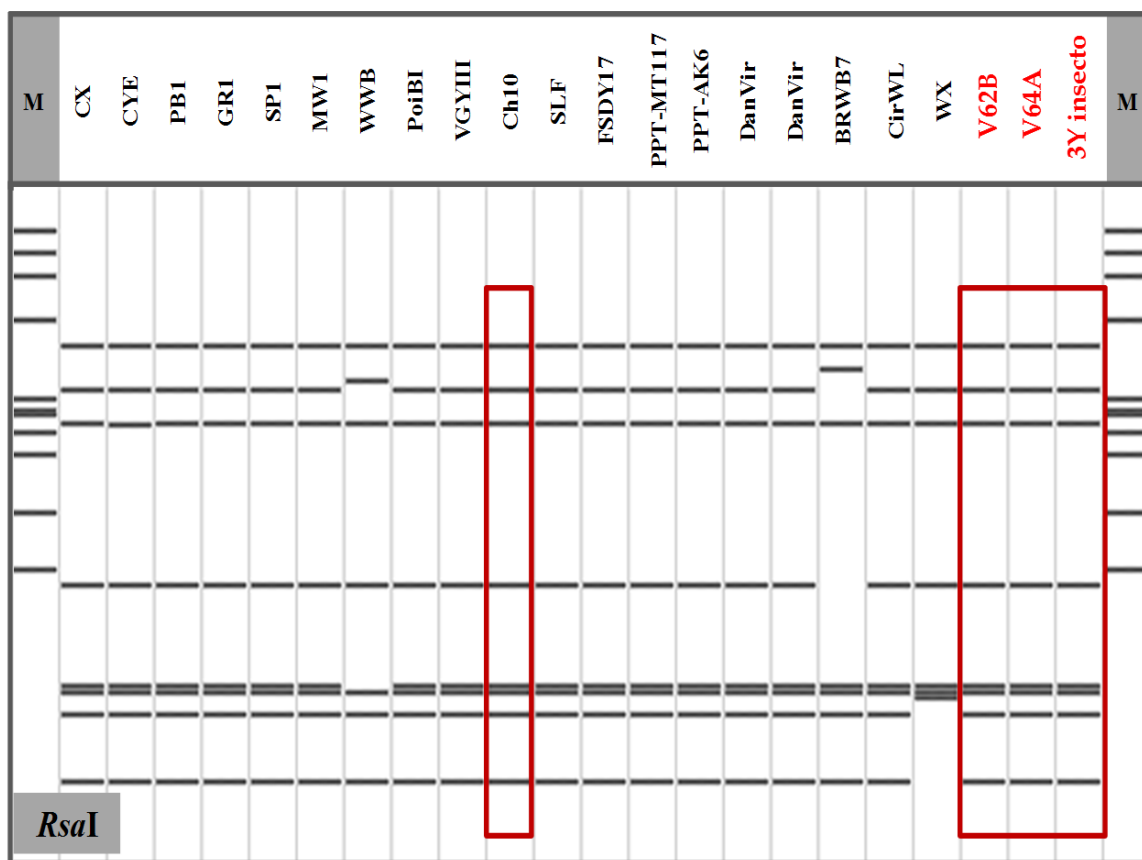


Figura 11. Perfiles de RFLP *in silico* digeridos con la enzima *RsaI* de las secuencias de los fragmentos amplificados en nested PCR con R16F2n/R2 del gen 16S rRNA de aislados de planta de vinca y *B. valdiviana* provenientes de pruebas de transmisión. Fitoplasmas de referencias al grupo ribosomal 16SrIII: CX (16SrIII-A), CYE (16SrIII-B), PB1 (16SrIII-C), GR1 (16SrIII-D), SP1 (16SrIII-E), MW1 (16SrIII-F), WWB (16SrIII-G), PoiBI (16SrIII-H), VGYIII (16SrIII-I), Ch10 (16SrIII-J), SLF (16SrIII-K), FSDY17 (16SrIII-L), PPT-MT117-1 (16SrIII-M), PPT-AK6 (16SrIII-N), Dan Vir (16SrIII-O), Dan Vir (16SrIII-P), BRWB7 (16SrIII-Q), CirWL (16SrIII-R) y WX (16SrIII-S) (Cuadro 7). Vc 62B: aislado de vinca correspondiente a la prueba de transmisión realizada en abril. Vc 64A: aislado de vinca correspondiente a la prueba de transmisión realizada en junio. I3Y: aislado representativo de *B. valdiviana*. M: marcador molecular PhiX174.

Sintomatología de las plantas de vinca positivas a fitoplasmas

Las plantas de vinca utilizadas en las pruebas de transmisión y positiva a fitoplasmas comenzaron a mostrar síntomas a los 6 meses posterior a las pruebas de transmisión, estos síntomas fueron leves, principalmente amarilleces y acucharamiento de las hojas nuevas y anomalías leves en las flores, deformaciones y pérdida de pigmentación (Fig. 12).

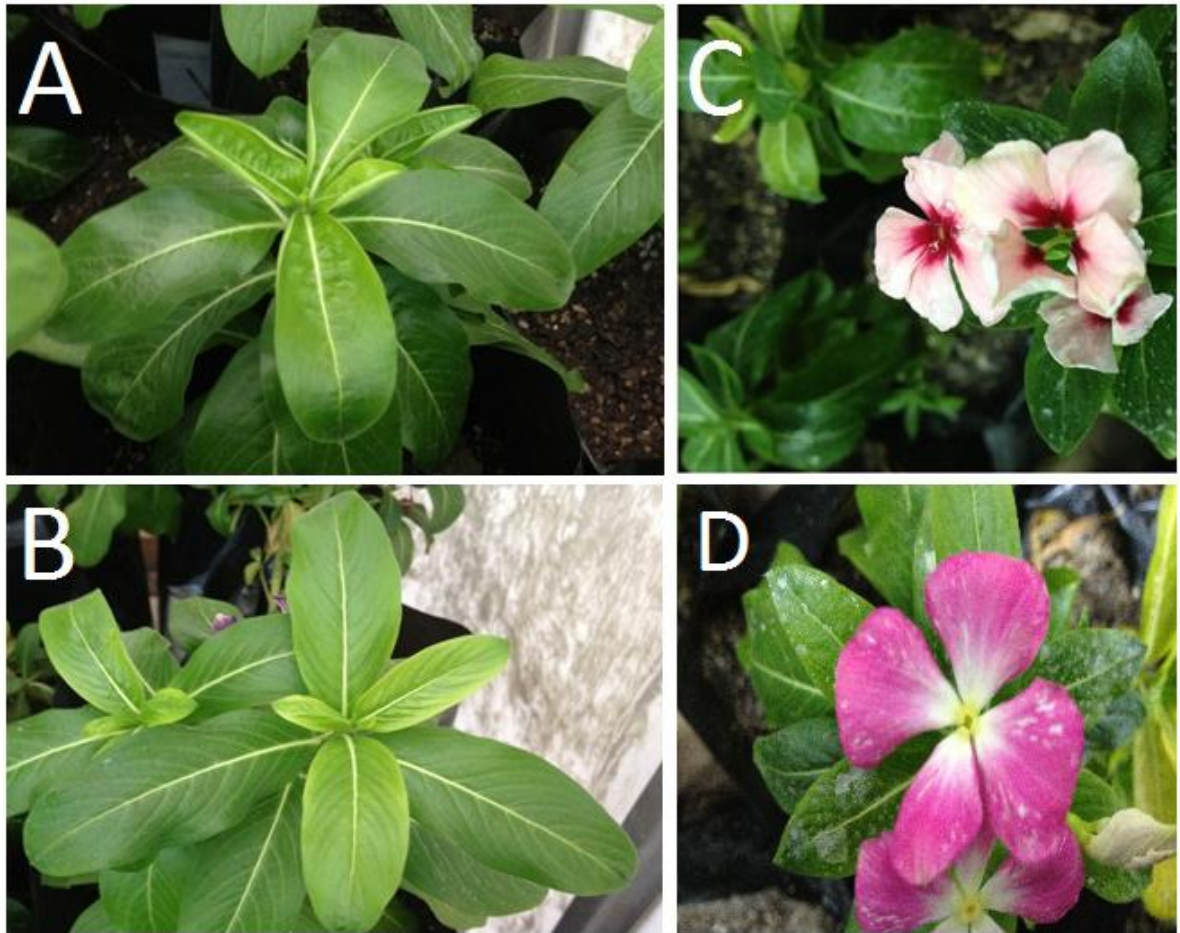


Figura 12. Síntomas de las plantas positivas a fitoplasmas a los 6 meses después de realizada la prueba de transmisión. A) Vinca 62A: acucharamiento y amarilleces de las hojas nuevas; B) Vinca 64B: amarilleces en los brotes nuevos; C) Vinca 62A: deformación de las flores ocasionada por la desunión del gineceo; D) Flores con menor cantidad de pétalos y con leve pérdida de pigmentación.

Durante los siguientes meses los síntomas se fueron intensificando y se asociaron principalmente a desordenes florales, pérdida de pigmentación y deformación de los pétalos (Fig. 13).



Figura 13. Síntomas de las plantas positivas a fitoplasmas a los 10 meses después de realizada la prueba de transmisión. A) Vinca 62A: despigmentación y menor tamaño de las flores; B) Vinca 64A: Deformación de los pétalos, pérdida de sutura del gineceo y menor cantidad de pétalos.

A los 14 meses la sintomatología era severa en ambas plantas positivas, un decaimiento y amarillez generalizada, floración escasa, flores deformes, despigmentadas y pequeñas.

La vinca 62A, presentó defoliación, necrosis de hojas, amarillez generalizada, hojas acucharadas y floración escasa (Fig. 14).

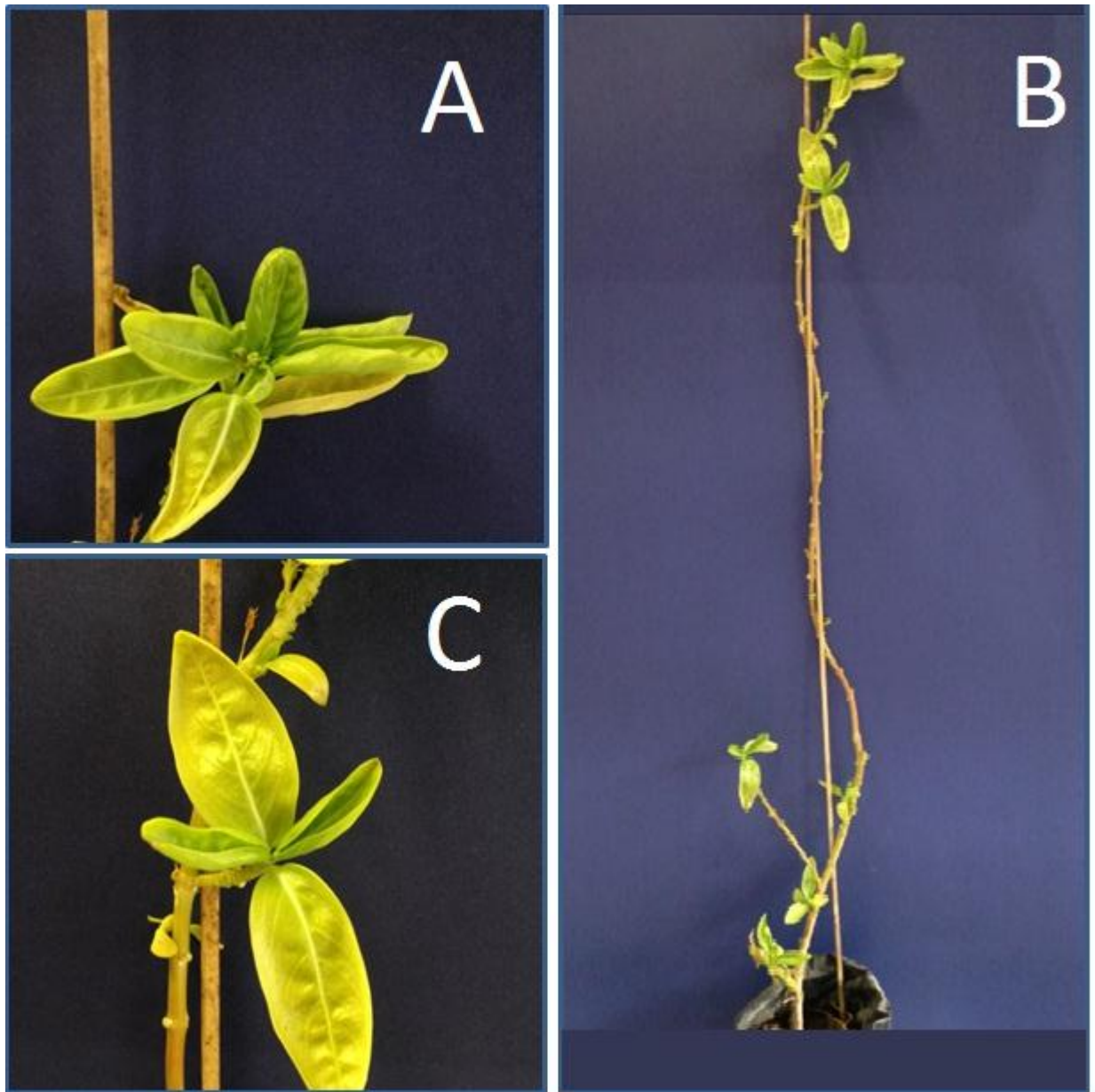


Figura 14. Síntomas a los 14 meses en la Vinca positiva 62A. A) brote con hojas de color verde pálido y acucharadas; B) planta completa con una notoria defoliación; C) brote amarillo con hojas nuevas deformes.

En cuanto a la Vinca 64B, presentó los mismos síntomas, pero a diferencia de la vinca 62A tuvo mayor proliferación de brotes laterales con entrenudos cortos (Fig. 15).

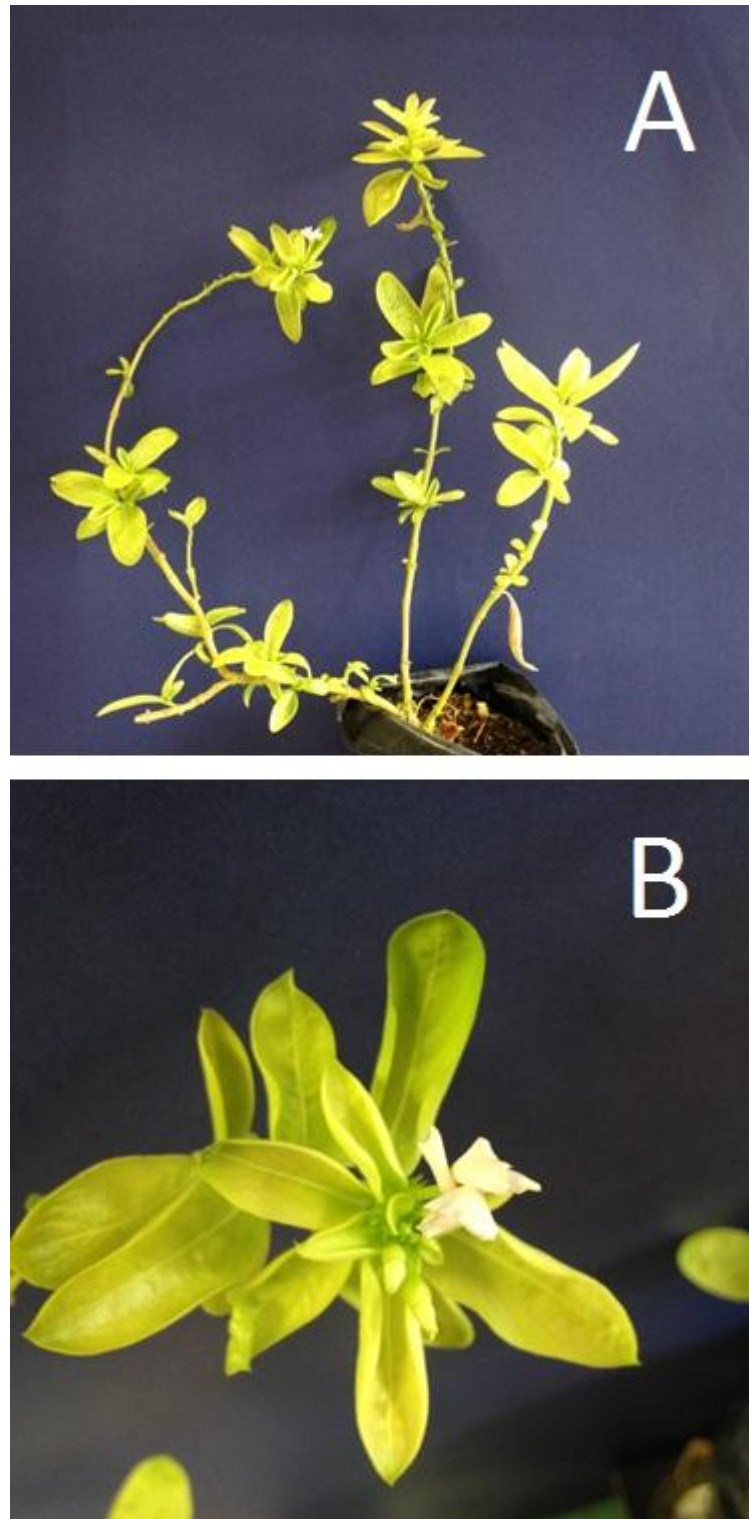


Figura 15. Síntomas a los 14 meses en la Vinca positiva 64B. A) Planta completa con defoliación, amarillez generaliza y proliferación de brotes cortos; B) Brote con entrenudos cortos, amarillez y flor terminal deforme y despigmentada.

Cabe recalcar que los controles negativos se comportaron de manera normal, es decir forma de las flores, color, producción de semillas y follaje en excelentes condiciones (Fig. 16).



Figura 16. Comparación entre una planta positiva (izquierda) y negativa (derecha) a fitoplasmas.

En la figura anterior es evidente la diferencia de color de las hojas y la forma de las flores entre las dos plantas.

Los síntomas expresados por las plantas positivas en este ensayo no presentaron filodia ni virescencia, sin embargo las fuertes amarilleces, brotes con entrenudos cortos y anomalías florales coinciden con síntomas descritos por varios autores (Chang, 1998; Omar *et al.* 2008; Chaturvedi *et al.*, 2009; Nejat *et al.*, 2010).

CONCLUSIONES

Bajo las condiciones en que se realizó este estudio y la metodología utilizada, los resultados obtenidos permiten señalar lo siguiente:

Dos de 42 plantas de vinca resultaron positivas a fitoplasmas posterior a las pruebas de transmisión, lo que se traduce en un porcentaje de transmisión de un 4,76 %. Éstas expresaron síntomas de amarilleces y desordenes florales.

El cicadélido *B. valdiviana* es vector del fitoplasma 16SrIII-J relacionado con ‘*Candidatus Phytoplasma pruni*’ y X-disease group. Correspondiendo a la primera referencia de transmisión de un fitoplasma por este insecto.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahrens, U. Y Seemüller, E. 1992. Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gen. Phytopathology. 82(8):828-832.
- Arismendi, N., Carrillo R. Y Riegel, R. 2011. Transmission in vivo of elm yellows phytoplasma (16SrV) by *Amplicephalus curtulus* (Hemiptera: cicadellidae) in ryegrass (*Lolium multiflorum* cv. Tama). Pp79 In: Hemipteran-Plant Interactions Symposium. Piracicaba, San Pablo, Brasil July 11-14, 2011. Universidad de San Pablo. ESALQ, Piracicaba, Brazil.
- Avinent, L. Y Llácer, G. 1994. Detección de fitoplasmas en frutales mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Investigación Agraria. 2: 201-205.
- Avinent, L. Y Llácer G. (1996). Fitoplasmas y espiroplasmas fitopatógenos. En: Llácer, G., López, M., Traperó, A. Y Bello, A. (Eds). Patología Vegetal. Phytoma-España, 443-488.
- Bennett, C., Hills, F., Ehrenfeld, F., Valenzuela, J. Y Klein, C. 1967. Yellow wilt of sugar beet. Sugar Beet Technology. 14(6): 480- 510.
- Casals, P. 2009. Manejo de insectos, disminución de rechazos entomológicos en arándano. Comité de arándanos. [En línea]. Recuperado en: <<http://www.comitedearandanos.cl/pdf/3.11.200910.4.21.pdf> 2009 > Consultado el 15 de junio de 2014.
- Catalogue of life, 2011. Annual Checklist of leafhoppers. [En línea]. Recuperado en: <<http://www.catalogueoflife.org/annualchecklist/2011/search/all/key/bergallia+valdiviana/match/1>> Consultado el: 27 de noviembre de 2014.
- Chang, C. 1998. Pathogenicity of aster yellows phytoplasma and *Spiroplasma citri* on periwinkle. Phytopathology. 88:1347-1350.
- Chaturvedi, Y., Tewari, A., Upadhyaya, P., Prabhuji S. Y Rao G. 2009. Association of ‘*Candidatus* phytoplasma asteris’ with little leaf and phyllody disease of *Catharanthus roseus* L. In Eastern Uttar Pradesh, India. Medicinal Plants. 1(2): 103-108.
- Dughetti, A. Y Lanati, S. 2013. Manual de producción de zanahoria. Capítulo 6. Plagas de la zanahoria y su manejo. INTA. Gobierno de Argentina. [En línea]. Recuperado en: <http://inta.gob.ar/documentos/Manualdeproducciondezahoria/at_multi_download/file/INTA/%20Cap%206.%20Plagas%20de%20la%20zanahoria%20y%20su%20manejo.pdf> Consultado el: 24 de agosto de 2013.

FIA (Fundación para la Innovación Agraria). 2009. Resultados y lecciones en detección de virus y fitoplasmas en vid: Proyecto de innovación entre IV Región de Coquimbo y VII Región del Maule. Ministerio de agricultura, Santiago, Chile. 24p.

Fiore, N., González, F., Paltrinieri, S., Calari, A. Bertaccini A., Alma, A. Picciau, L. Y Araya, J. 2008. Phytoplasmas infecting grapevine in Chile: Potential insect vectors and reservoir plants. Pp 6. In: International Phytoplasma Workshop. Havana, Cuba September 22-26. Institute of plant Health Research. Havana, Cuba. 18p.

Fiore, N., González, F., Zamorano, A. Y Pino, A. 2010. Molecular characterization of new phytoplasmas of grapevine in Chile. XIX Congreso de la Sociedad Chilena de Fitopatología, Pucón –Chile 9 al 12 de Noviembre de 2010.

Fiore, N., González, F., Zamorano, A., Pino, A., Paltrinieri, S. Y Bertaccini, A. 2011. Identification of phytoplasma belonging to X-disease group in cherry in Chile- Bulletin of Insectology. 64: 235-236.

Fiore, N., Longone, V., González, F., Zamorano, A., Pino, A., Araya, J., Díaz, V., Paltrinieri, S., Calari, A., Bertaccini, A., Picciau, L. Y Alma, A. 2011. Epidemiological aspects of phytoplasmas in Chilean grapevines. Bulletin of Insectology. 64: 91-92.

Fiore, N., Longone, V., González, F., Zamorano, A., Pino, A., Araya, J., Paltrinieri, S., Bertaccini, A., Alma, A. Y Contaldo, N. 2012 Transmission of 16SrIII-J phytoplasma by *Paranatus exitiosus* Leafhopper. Proceedings of the 17th Congress of ICVG: 230-231. Davis, California, USA.

Fiore, N., Zamorano, A., González, X., Quiroga N., Paillalef, R. Y Pino, A. 2015. Phytoplasmas associated with yellow wilt disease of sugar beet in Chile Phytopathogenic Mollicutes. 5: 63-64.

Fiore, N., Zamorano, A., González, X., Quiroga N. Y Pino, A.M. 2015. Detection of 16SrIII-J phytoplasma in *Galega officinalis* L., a weed commonly associated to pome fruit orchards in Chile. Phytopathogenic Mollicutes. 5: 115-116.

Green, M., Thomsom D. Y Mackenzi, D. 1999. Easy and efficient DNA extraction from woody plants for the detection of phytoplasmas by polymerase chain reaction. Plant Disease. 83(5): 482-485.

Gundersen, D. Y Lee, M. 1996. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested PCR assays using two universal primers pairs. Phytopathologia Mediterranea. 35: 144-151.

Hanboonsong, Y., Ritthison, W., Choosai, C. Y Sirithorn, P. 2006. Transmission of sugarcane white leaf phytoplasma by *Yamatotettix flavovittatus*, a new leafhopper vector. Journal Economic Entomology. 99: 1531-1537.

- Henson, J. Y French, R. 1993. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. Annual review of phytopathology. 31: 81-109.
- Jarausch, W., Danet, J., Labonne, G., Dosba, F., Broquaire, J., Saillard, C. Y Garnier, M. 2001. Mapping the spread of apricot chlorotic leaf roll (ACLR) in southern France and implication of *Cacopsylla pruni* as a vector of European stone fruit yellows (ESFY) phytoplasmas. Journal Plant Pathology. 50: 782-790.
- Laviña, A. Y Batlle, A. 1997. Identificación de fitoplasmas de la viña en diferentes áreas vinícolas de España. Técnicas de Identificación. Viticultura Profesional. 52: 32-36.
- Laviña, A., Batlle, A., López, C. Y García J. 2000. Identificación de una sintomatología producida por un fitoplasma en aguacate. En: X Congreso de la Sociedad Española de fitopatología. Octubre 3-6, 2000, Valencia. Sociedad Española de Fitopatología. España.
- Lee, I., Gundersen, D., Hammond, R. Y Davis, R. 1994. Use of mycoplasma-like organisms (MLO) group-specific oligonucleotide primers for PCR nested assays to detect mixed-MLO infections in a single host plant. Phytopathology. 84 (6): 559-566.
- Longone, V., González, F., Zamorano, A., Pino, A. Araya, J., Díaz, V., Paltrinieri, S., Calari, A., Bertaccini, A., Picciau, L., Alma, A. Y Fiore, N. 2011. Epidemiological aspects of phytoplasmas in Chilean Grapevines. Bulletin of Insectology. 64: 1721-8861.
- Lorenz, K., Schneider, B., Ahrens, U. Y Seemüller, E. 1995. Detection of the Apple proliferation and pear decline phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and nonribosomal DNA. Phytopathology. 85 (7): 771-776.
- Maixner, M., Reinert, W. Y Darimont, H. 2000. Transmission of grapevine yellows by *Oncopsis alni* (Schrank) (Auchenorrhyncha: Macropsinae). Vitis. 39: 83-84.
- Montano, H., Davis R., Dally, E. Pimentel, J. Y Brioso, P. 2000. Identification and phylogenetic analysis of a new phytoplasma from diseased chayote in Brazil. Plant Disease. 84 (4): 429-436.
- Namba, S., Kato, S., Iwanami, S., Oyaiza, H., Shiozawa, H. Y Tsuchizaki, T. 1993. Detection and Differentiation of plant pathogenic mycoplasma-like organisms using polymerase chain reaction. Phytopathology. 83 (7): 786-791.
- Nejat, N., Sijam, K., Abdullah, S., Vadamalai, G. Y Dickinson, M. 2010. Molecular characterization of an aster yellows phytoplasma associated with proliferation of periwinkle in Malaysia. African Journal of Biotechnology 9(15): 2305-2315.
- Omar, A., Emeran, A. Y Abass, J. 2008. Detection of phytoplasma associated with periwinkle virescence in Egypt. Plant Pathology Journal 7(1): 92-97.

Romero, J. 1997. VII curso internacional teórico práctico de detección e identificación de virus, viroides y fitoplasmas. CIT / UNIA. Madrid, España.

Schaff, A., Lee, M. Y Davis, E. 1992. Sensitive detection and identification of mycoplasma-like organisms by polymerase chain reaction. Biochemistry Biophysics Research Communications 186: 1503-1509.

Tamura K., Dudley, J. Nei, M. Y Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution. 24:1596-1599.

Vega, F., Davis, R., Barbosa, P., Dally, E., Purcell, A. Y Lee, I. 1993. Detection of a plant pathogen in nonvector insects species by Polymerase Chain Reaction. Phytopathology 83(6):621-624.

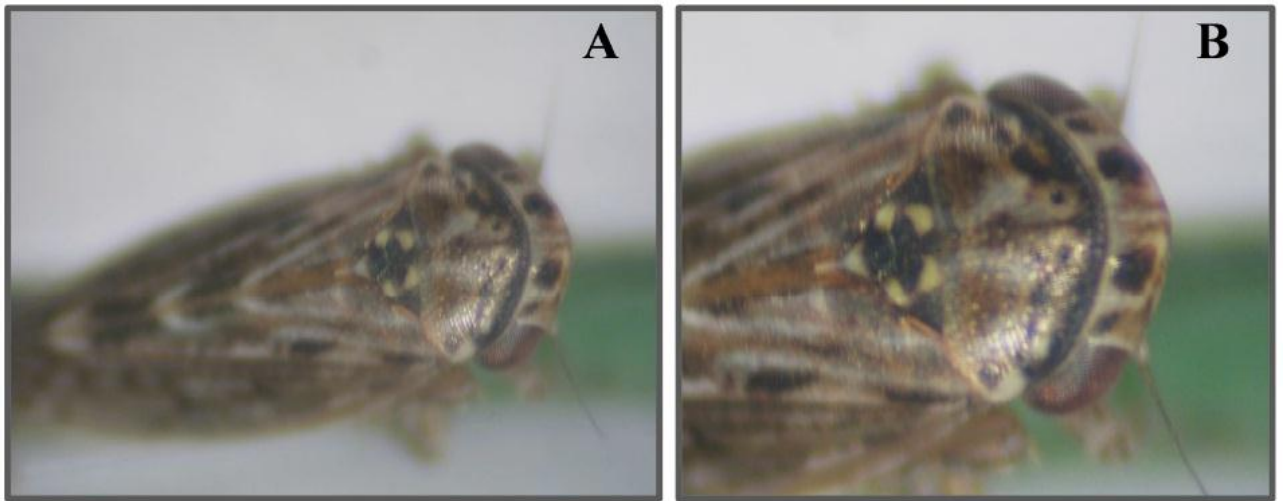
Waterwork, H. Y Mock, R. 1999. An assessment of nested PCR to detect phytoplasmas in imported dormant buds and intermodal tissues of quarantined tree fruit germ plasm. Plant Disease. 83(11): 1047- 1050.

Zhang, Y., Uyenoto, J. Y Kirpatrick B. 1998. A small-scale procedure for extracting nucleic acids from woody plants infected with various pathogens for PCR assay. Journal of Virology Methods. 71: 45-50.

Zhao, Y., Wei, W., Lee, I., Shao, J., Suo X. Y. Davis, R. 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 systemaic and evolutionary microbiology. 59: 2582-2593.

ANEXO I

Características morfológicas de un A) adulto de *Bergallia valdiviana*. B) Detalle de la zona dorsal.



Características morfológicas de *Bergallia valdiviana*: A) macho; B) hembra

