



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS**  
**ESCUELA DE PREGRADO**

MEMORIA DE TÍTULO

**ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DEL FITOPLASMA 16SrXIII-F  
ASOCIADO AL CULTIVO DE LA FRUTILLA EN CHILE**

MELISA FRANCISCA BELÉN NAVARRETE YÁÑEZ

SANTIAGO, CHILE  
2022



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS**  
**ESCUELA DE PREGRADO**

MEMORIA DE TÍTULO

**ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DEL FITOPLASMA 16SrXIII-F  
ASOCIADO AL CULTIVO DE LA FRUTILLA EN CHILE**

**EPIDEMIOLOGICAL ASPECTS OF 16SrXIII-F PHYTOPLASMA  
ASSOCIATED TO STRAWBERRY IN CHILE**

MELISA FRANCISCA BELÉN NAVARRETE YÁÑEZ

SANTIAGO, CHILE  
2022



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS**  
**ESCUELA DE PREGRADO**

MEMORIA DE TÍTULO

**ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DEL FITOPLASMA 16SrXIII-F  
 ASOCIADO AL CULTIVO DE LA FRUTILLA EN CHILE**

Memoria para optar al título profesional de  
 Ingeniera Agrónoma

MELISA FRANCISCA BELÉN NAVARRETE Y ÁÑEZ

Profesores Guías		Calificación
Sr. Nicola Fiore Ingeniero Agrónomo, Dr. Cs.		7.0
Sr. Alan Zamorano C. Bioquímico, Dr. Cs.		6.8
Profesores Evaluadores		
Sr. Jaime Auger S. Ingeniero Agrónomo, MS. Ph.D.		6.9
Sra. Cecilia Baginsky G. Ingeniera Agrónoma, Dra.		6.7

Santiago, Chile

2022

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no habría sido posible sin la participación y apoyo de diferentes personas, como el profesor Nicola Fiore que me ayudo desde un principio a realizar esta investigación, me abrió las puertas del laboratorio, me apoyó en las recolecciones, salidas a terreno y en el aula de clases, gracias por todo.

Gracias al profesor Alan Zamorano por brindarme tanto conocimiento sobre biología molecular y apoyarme a lo largo de todo mi camino como estudiante, siempre voy a estar agradecida por todo lo que me enseñó y apoyó en este largo proceso, muchas gracias por ser un maestro en todo los sentidos.

A la doctora Weier Cui que fue mi compañera y maestra en todo el procedimiento, tanto de las salidas a terreno, como del trabajo en laboratorio, gracias por la paciencia, el cariño y todos los conocimientos entregados, siempre voy a estar agradecida por haber sido parte de su investigación, muchas gracias sensei.

A mis amigas y amigos de universidad que siempre me apoyaron en todos estos años y fueron fundamentales en todos mis procesos, gracias por toda la empatía y el amor a lo largo de estos años.

Gracias Belén, Catalina, Salomé y María Ignacia por apoyarme toda la vida y siempre creer en mi valor pesar de todo, por amarme y siempre levantarme en los momentos más difíciles, esto también es gracias a ustedes.

A mi mamá que siempre estuvo presente en todo mi proceso universitario, gracias por enseñarme a valorar los aprendizajes de la vida y brindarme la oportunidad desde que era una niña a seguir estudiando y aprendiendo, gracias por todo mamita.

A mi hermano que ha sido un pilar fundamental en todos los procesos académicos y de la vida, juntos hemos aprendido y crecido a lo largo de los años.

A mi papá que me brindo todo su apoyo a lo largo de mi educación dentro de sus capacidades, muchas gracias papá.

A la ingeniera Agrónoma Marisol Flores Sepúlveda por motivarme y exigirme a cerrar los ciclos, gracias Marisol, parte de este proceso fue gracias a ti y siempre estaré agradecida de habernos topado en esta vida gracias a la práctica profesional.

A mi equipo de laboratorio y a la Academia por enseñarme y apoyarme todos estos años. Gracias al equipo de secretaria de estudios por toda la ayuda brindada para cerrar esta última etapa.

Gracias a los profesores evaluadores por el tiempo entregado en este trabajo y su disposición. Finalmente y no menos importante, gracias a mí por creer todo este tiempo en mis capacidades y saber valorar todo mi esfuerzo a lo largo de los procesos.

## INDICE

INDICE .....	4
RESUMEN .....	5
INTRODUCCIÓN .....	7
Hipótesis.....	10
Objetivo general .....	10
MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
Lugar de estudio.....	11
Materiales.....	11
Metodologías.....	11
Recolección e identificación de plantas hospederas secundarias e insectos. ....	11
Extracción de ADN de plantas e insectos .....	12
Detección e identificación de fitoplasmas en plantas hospedera secundaria e insectos.....	13
RESULTADOS .....	14
Recolección y clasificación taxonómica de las plantas hospederas secundarias .....	14
Captura e identificación de los insectos .....	17
Identificación molecular de los insectos .....	18
Detección e identificación de los fitoplasmas encontrados en malezas e insectos.....	19
DISCUSIÓN .....	23
CONCLUSIONES .....	27
BIBLIOGRAFÍA.....	28

## RESUMEN

Para determinar cuáles son las plantas reservorio y los potenciales insectos vectores de fitoplasmas del grupo ribosomal 16SrXIII que infectan al cultivo de la frutilla en Chile, se realizó un muestreo desde el 26 agosto 2019 hasta el 3 marzo 2020 en un huerto orgánico infectado con el fitoplasma en la comuna de Litueche, provincia Cardenal Caro, en la región de O'Higgins. En el huerto y en sus alrededores, se colectaron plantas no frutilla y se capturaron insectos. Solo el fitoplasma 16SrXIII-F se identificó en una planta de *Galega officinalis* y en 9 individuos de insectos *Cixiosoma* sp., pertenecientes a la familia Cixiidae. La identificación molecular de los insectos capturados indica que no hay informaciones disponibles en genbank y es necesario retroalimentar el banco genético con las nuevas secuencias. Es la primera detección en el mundo de este fitoplasma 16SrXIII-F en *G. officinalis* y en el cixido *Cixiosoma* sp. Se concluye que *G. officinalis* es una especie vegetal reservorio del fitoplasma 16SrXIII-F y el insecto *Cixiosoma* sp. es un potencial vector del mismo patógeno. Es necesario realizar las pruebas de transmisión para corroborar si el insecto es o no un vector del fitoplasma

**Palabras claves:** `Candidatus Phytoplasma', nested-PCR, RFLP, 16SrXIII, cytC, weeds.

## ABSTRACT

To order to determine which are the reservoir plants and the potential insect vectors of the phytoplasmas belonging to the ribosomal group 16SrXIII that infect strawberry crops in Chile, from August 2019 to March 2020 a sampling was carried out in an infected organic orchard in Litueche, Cardenal Caro province, O'Higgins region. In the orchard and its surroundings, non-strawberry plants were collected and insects were captured. The 16SrXIII-F phytoplasma was identified in one *Galega officinalis* plant and in 9 individuals belonging a *Cixiosoma* sp., of the Cixiidae family. The molecular identification of the captured insects indicates that there is no information available in the genbank and the means to feed back the genbank with the new classifications data. This is the first detection in the world of 16SrXIII-F phytoplasma in *G. officinalis* and *Cixiosoma* sp. Concluding, *G. officinalis* is a reservoir plant species of the phytoplasma 16SrXIII-F and *Cixiosoma* sp. is a potential vector of the same pathogen. Transmission trials must be performed to confirm whether or not the insect is a vector of the phytoplasma.

**Keywords:** 'Candidatus Phytoplasma', nested-PCR, RFLP, 16SrXIII, *cytC*, Malezas.

## INTRODUCCIÓN

La frutilla (*Fragaria x ananassa* Duch.) pertenece a la familia de las rosáceas. Es una especie híbrida originaria de un cruzamiento entre dos especies, *Fragaria chiloensis* L. y *Fragaria virginiana* Duch. Su propagación vegetativa se realiza por estolones, los cuales son rastreros y forman raíces a partir del segundo nudo, pudiendo formar de 4 a 6 plantas a partir de 10 a 12 estolones (Bañados *et al.*, 2015). Se cultiva en distintas zonas climáticas, pero los rendimientos más altos se obtienen en zonas templadas, sin vientos ni heladas cercanas al periodo de la floración y sin lluvias ni elevadas temperaturas en épocas de cosecha. Las temperaturas óptimas para fructificación oscilan entre 15-20°C, temperaturas inferiores a los 12°C generan estragos en la polinización y posterior cuaja, generando frutos con deformaciones. Sin embargo, durante la fase vegetativa, las plantas son capaces de soportar heladas. La frutilla requiere suelos franco-arenosos, con buena aireación, profundidad de 80 cm, con un rango de pH que oscila entre 5,8 y 7,2. La conductividad eléctrica del suelo debe ser inferior a 1dS/m, además de contar con un alto contenido de materia orgánica, idealmente entre 2,5% a 3,5%. La producción de este cultivo en Chile se extiende desde La Serena hasta Puerto Montt, siendo de alta adaptabilidad en gran parte del territorio, pero desde la región Metropolitana hasta la región del Maule se concentra el 80% de la producción total del país. El cultivo está sujeto al daño causado por un alto número de plagas y enfermedades, por lo tanto, el manejo fitosanitario es considerado un factor que incide directamente en los niveles de producción (Leiva *et al.*, 2017).

Entre los diferentes agentes infecciosos asociados a la frutilla, se encuentran los fitoplasmas, objeto de este trabajo. Los fitoplasmas afectan a cientos de especies vegetales y el impacto económico de su infección en diversos cultivos se extiende a diversas áreas geográficas y para diferentes cultivos (Costanzo, 2012). Los fitoplasmas son bacterias sin pared celular pertenecientes a la clase Mollicutes, por esta razón son resistentes a antibióticos que inhiben la síntesis de la pared celular de las bacterias (Rebolledo, 2016). Se transmiten a través de la propagación de material vegetal infectado y por insectos vectores. En algunas especies vegetales se ha corroborado también la transmisión por semilla botánica y, en algunas especies de insectos vectores, la transmisión transovárica (Bai, 2004; Botti y Bertaccini, 2006; Bertaccini y Lee, 2018). Los insectos vectores poseen un aparato bucal picador-succionador y se alimentan del floema de las plantas. La modalidad de transmisión por insectos es de tipo persistente-propagativa, lo que indica que estos patógenos se replican en los tejidos de los insectos vectores. Solo al término del período de latencia de la enfermedad en el vector, que según la especie de insecto y de fitoplasma puede variar de 7 a 80 días, el insecto infectado puede transmitir el fitoplasma durante

su actividad trófica (Hogenhout *et al.*, 2008). Debido a que los fitoplasmas no tienen la capacidad de sintetizar todos los nutrientes necesarios para su metabolismo, utilizan en buena parte aquellos producidos por las células floemáticas de las plantas. Por lo tanto, su infección produce cambios en el balance de fitohormonas y en reguladores de crecimiento, provocando con ello diferentes síntomas. La mayoría de los fitoplasmas pueden inducir enanismos, amarilleces, proliferación de yemas, ramas y hojas (sintomatología conocida como “escoba de bruja”), virescencia (pétalos florales verdes), y filodia (conversión de flores a hojas) (Bertaccini, 2007).

Durante los últimos años, la investigación ha generado nuevos conocimientos sobre la interacción entre las plantas y los insectos vectores de los fitoplasmas, con nuevas antecedentes acerca de su distribución geográfica y de las relaciones filogenéticas entre las diferentes cepas de fitoplasmas identificadas en todo el mundo. En gran parte, este progreso es el resultado del desarrollo y uso de métodos moleculares para detectar, identificar y clasificar a estos patógenos, siendo dificultoso aislarlos en medio de cultivo (Contaldo *et al.*, 2012; 2016). El sistema de clasificación actualmente utilizado se basa en la secuencia del gen 16S rRNA por el cual, una cepa puede ser reconocida como nueva *Candidatus Phytoplasma* (*Ca. P.*) especie si la secuencia completa de su gen 16S rRNA posee <98,65% de similitud con cualquiera *Ca. P.* previamente descritas. La cepa cuya secuencia posee <98,65% de similitud con una de referencia, pero >98,65% con otra/s perteneciente/s a la misma *Ca. P.* especie, debe considerarse como cepa relacionada a la de referencia de esta *Ca. P.* especie. Cuando una nueva cepa con identidad de secuencia de su gen 16S rRNA es  $\geq 98,65\%$  a la de una *Ca. P.* especie conocida, es posible que la nueva cepa se asigne a una nueva *Ca. P.* especie cuando, comparando las secuencias nucleotídica completas, ambos genomas presentan una identidad inferior al 95%. Cuando las secuencias del genoma completo no están disponibles, se pueden usar dos de los genes conservados para completar la clasificación (Bertaccini *et al.*, 2022). Esta nueva clasificación permite uniformar el criterio de identificación/clasificación de los fitoplasmas, con la ventaja de abandonar la comparación de patrones de restricción enzimática (restriction fragment length polymorphism - RFLP), utilizando siempre la secuencia el gen 16S rRNA, para completar la identificación de los fitoplasmas en grupo y subgrupos ribosomales (Lee *et al.*, 1998; Bertaccini *et al.*, 2022). Hasta la fecha, han sido identificadas oficialmente 49 *Candidatus Phytoplasma* especies y alrededor de 300 subgrupos ribosomales (Bertaccini 2022; Bertaccini *et al.*, 2022).

En relación a los tipos de plantas hospederas y de vectores, se observa una cierta variabilidad en la distribución geográfica de algunas especies de fitoplasmas. Sin embargo, parece que la gama de especies de plantas que pueden ser infectadas por un fitoplasma está determinada en gran medida por el

número de especies de insectos vectores que son capaces de transmitir el fitoplasma y por las costumbres alimenticias de estos vectores (monófagos, oligófagos, polífagos) (Bosco y Tedeschi, 2013). Los hospederos alternativos a las plantas de interés agronómico representan importantes fuentes de reservorio tanto de los fitoplasmas como de los insectos vectores, manteniendo una constante presión del inóculo del patógeno en un determinado territorio.

En Chile, durante los últimos cinco años, se ha reportado un aumento de casos de una enfermedad en frutilla asociada a dos fitoplasmas pertenecientes a los subgrupos ribosomales 16SrXIII-F y 16SrXIII-K (Cui *et al.*, 2019b). El primero de los dos fitoplasmas, también está presente en Argentina y Brasil, siempre en frutilla. En ninguno de los países involucrados se ha realizado un estudio epidemiológico, por lo tanto, en las áreas de cultivo de la frutilla en las cuales aparece la enfermedad, la identificación tanto de hospederos secundarios, como también de potenciales insectos vectores, es de fundamental importancia para prevenir la diseminación de estos patógenos (Fernández *et al.*, 2015), es por esto que se propone la siguiente hipótesis:

**Hipótesis**

En huertos de frutilla infectados por los fitoplasmas 16SrXIII-F y 16SrXIII-K, se encuentran insectos y hospederos secundarios, a su vez infectados por los mismos fitoplasmas.

**Objetivo**

Determinar presencia de los fitoplasmas pertenecientes al grupo ribosomal 16SrXIII en insectos y plantas asociadas al cultivo de la frutilla.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Lugar de estudio**

La colecta de insectos y plantas se realizó en la comuna de Litueche, provincia Cardenal Caro en la región de O'Higgins, en un huerto orgánico de frutilla infectado por los fitoplasmas pertenecientes a los subgrupos ribosomales 16SrXIII-F y 16SrXIII-K (Figura 1). El muestreo se realizó entre las plantas de frutilla, que ocupan la superficie de una hectárea y en sus alrededores, hasta diez metros desde el huerto de frutilla.

Los análisis de las muestras se realizaron en el laboratorio de Fitovirología de la Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas, Departamento de Sanidad Vegetal.

### **Materiales**

Para la captura de insectos se utilizó una red entomológica y tubos de vidrio, los cuales se colocaron en gradillas. Las muestras de plantas hospederas secundarias (no frutilla) se colocaron en bolsas de plásticos. Tanto los insectos como el material vegetal, se mantuvieron en un refrigerador portátil con hielo durante el traslado al laboratorio. Para la identificación de los insectos encontrados se utilizó una Lupa binocular LEICA S6D.

Para la extracción de ADN desde insectos y plantas se utilizó un mortero, micropipetas, tampón de extracción, mercaptoetanol al 0,2 % (v/v), tubos Eppendorf de 1,5 mL, fenol, cloroformo, centrifuga refrigerada, isopropanol y etanol al 70%, refrigerador, congelador.

Para PCR se utilizaron partidores para la detección de fitoplasmas, enzima Taq Polimerasa platinum, tampón 10X, agua destilada y termociclador. Azul de bromofenol, xilencianol, glicerol, gel de agarosa al 1%, bromuro de etidio, instrumental para la electroforesis y transiluminador de luz ultravioleta, se necesitaron para visualizar los productos de amplificación de PCR.

### **Metodología**

#### **Muestreo e identificación de plantas hospederas secundarias e insectos**

El muestreo para la colecta de insectos y plantas no frutilla presentes en el huerto, comenzó el día 26 agosto del 2019 y terminó el 3 marzo del 2020. Para la captura de los insectos se realizaron 150 barridos por visita, con una red entomológica orientada hacia las malezas presentes en el predio. Los insectos capturados fueron colocados inmediatamente en tubos de ensayo, con un tapón de algodón para evitar su deshidratación. Las plantas colectadas se eligieron por presentar síntomas asociados a infecciones de fitoplasmas, como clorosis, crecimiento vegetativo desuniforme, con los entrenudos cortos, hojas con tonalidades violetas y ausencia de floración. Una vez colectadas, las plantas se

colocaron en bolsas plásticas que se guardaron en un refrigerador portátil con gel packs, hasta la llegada al laboratorio. En el laboratorio, las muestras de plantas se conservaron en un congelador a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de la extracción del ADN. Para identificar las malezas colectadas, se utilizó el libro “Malezas de Chile” (Espinoza, 2017) y se recurrió al apoyo profesional de la profesora Verónica Díaz de la Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas, Departamento de Producción Agrícola.

Los insectos con aparato bucal picador-succionador, se separaron en distintos grupos según sus características morfológicas macroscópicas. Finalmente, para la identificación a nivel de especie, individuos machos y hembras se enviaron al profesor Alberto Alma de la Universidad de Turín, Italia, y al Investigador Juan Francisco Campodónico de la Universidad Austral de Valdivia, expertos en la identificación morfológica de insectos vectores de fitoplasmas, quienes analizaron los especímenes a través de estereoscopía y de claves taxonómicas (Ribaut, 1936; 1952; Della Giustina, 1989). Para la identificación molecular de los insectos, los fragmentos de amplificación gen mitocondrial *cytC* (citocromo C) obtenidos por PCR, fueron secuenciados en los dos sentidos del ADN en la empresa Psomagen Inc. (MD, EEUU). Para cada muestra, las secuencias del sentido codificante como su complementaria, fueron ensambladas en el programa online CAP3-Sequence Assembly Program-PRABI-Doua, y así se obtuvo la secuencia definitiva para cada especie. Estas secuencias resultantes fueron analizadas en la plataforma BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool nucleotide), en la sección determinada para secuencias de nucleótidos, donde fue posible buscar la identidad de la especie y/o género en base a la similitud de secuencias nucleotídicas. Las secuencias obtenidas se compararon con las disponibles en genbank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank)) y se realizaron análisis filogenéticos utilizando los programas Bioedit (Hall, 1999) y Mega v6.0 (Tamura *et al.*, 2013).

### **Extracción de ADN de plantas e insectos**

La extracción de ADN desde plantas e insectos se realizó mediante el protocolo modificado propuesto por Zhang *et al.* (1998), que consiste en el uso de fenol-cloroformo en tampón tris-EDTA pH 8,0.

La extracción de ADN de las plantas se realizó a partir del floema de las nervaduras de las hojas. Para lo cual se molieron 200mg de material vegetal fueron molidos en un mortero con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. Después se agregaron 1,5 mL de buffer de maceración (100 mM de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 30 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 10% de sacarosa, 2% de PVP, 0,15 % de BSA fracción V y 30 mM de ácido ascórbico) para ser transferido a un tubo de 15 mL. Posterior a esto, el macerado se centrifugó durante 30 minutos a 12.000 g a  $4^{\circ}\text{C}$ , al final se eliminó el sobrenadante. Al precipitado se le agregaron 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  $\mu\text{L}$  de N

lauryl-saucosil al 10 %, después se mezcló todo por inversión. Después los tubos se incubaron a 55°C durante 120 minutos. Terminada la incubación se procedió a centrifugar durante 10 minutos a 7500g a 4°C. El sobrenadante fue transferido a un tubo con 2,5 mL de isopropanol (0,6 v/v) y posterior a esto incubó a -20°C durante 30 minutos. Después se centrifugó por 15 minutos a 7.500g a 4°C, terminado este proceso se eliminó el sobrenadante. Se recuperó el precipitado para resuspenderlo 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 mezclaron por inversión para después incubar a 37°C por 1 hora. Tras este procedimiento se añadieron 525 µL de NaCl 5M y 420 µL de CTAB/ NaCl (CTAB al 10% y 0,7M de NaCl). Finalmente, se mezclaron e incubaron a 65°C por 10 minutos, terminado este tiempo se agregaron 2 mL de cloroformo: alcohol isoamilico 24:1 y 2 mL de fenol saturado en TE 1X pH8, para ser agitado y posteriormente centrifugados por 10 minutos a 6500g a 4°C. La fase superior se colocó en un tubo con 2,5 mL de isopropanol (0,6 v/v), se mezcló por inversión y se dejó a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente, se centrifugó por 30 minutos a 12000g a 4°C, para después descartar el sobrenadante. Finalmente, el precipitado del ADN 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 mantuvieron abierto para permitir la evaporación del alcohol etílico. El ADN se resuspendió en 50 a 200 µL de buffer TE 1X pH8.0 y se guardó a 4°C.

Para la extracción de ADN desde insectos se utilizó el mismo protocolo, pero reduciendo proporcionalmente los volúmenes de los reactivos, según el peso del insecto a analizar. Cada individuo se analizó por separado.

El ADN desde plantas e insectos se cuantificó con espectrofotómetro, de manera de verificar la calidad y cantidad del mismo.

### **Detección e identificación de fitoplasmas en plantas hospedera secundaria e insectos**

Para la detección de los fitoplasmas en las muestras de plantas e insectos, se realizó un primer PCR con los partidores P1/P7, utilizando extractos de ADN cuya concentración se ajustó a 30 ng/µL. El contenido del tubo de reacción del primer PCR se diluyó 100 veces para ser utilizado en el PCR anidado utilizando los partidores F2/R2 (Schaff *et al.*, 1992; Gundersen and Lee, 1996). Los amplicones obtenidos fueron secuenciados por la empresa Psomagen USA Corp. (Rockville, MD, EEUU).

Las secuencias obtenidas se compararon con las de referencias de fitoplasmas disponibles en genbank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank)) y se realizaron análisis filogenéticos utilizando los programas Bioedit (Hall, 1999) y Mega v6.0 (Tamura *et al.*, 2013). Para la identificación de los fitoplasmas se utilizó el análisis de polimorfismo de longitud de *los fragmentos de restricción in silico* (RFLP) utilizando las secuencias obtenidas por PCR (Zhao *et al.*, 2013).

## RESULTADOS

Se realizaron siete muestreos, saliendo a terreno aproximadamente cada 25 días durante las estaciones de primavera 2019 (final de agosto) y verano 2020 (inicio de marzo). Durante estas actividades se colectaron 80 plantas y se capturaron 102 insectos.



**Figura 1.** Huerto de frutillas con manejo orgánico y alta presencia de malezas, presente en comuna de Litueche, provincia Cardenal Caro, región de O'Higgins.

### **Muestreo y clasificación taxonómica de las plantas hospederas secundarias**

Las 80 plantas colectadas se identificaron como pertenecientes a 21 especies vegetales con un crecimiento anuales y perennes, clasificándose también como nativas o introducidas. El síntoma más común en todas las plantas muestreadas fue la clorosis de las hojas (Cuadro 1; Figura 2).

**Cuadro 1.** Especies de plantas colectadas y síntomas asociados.

<b>Especie</b>	<b>N° de muestras</b>	<b>Hábito de vida</b>	<b>Origen</b>	<b>Síntomas</b>
<i>Convolvulus arvensis</i> L.	7	Perenne	Introducida	Clorosis, crecimiento desuniforme y entrenudos cortos
<i>Rubus ulmifolius</i> Schott	19	Perenne	Introducida	Clorosis y hojas rojizas
<i>Anagallis arvensis</i> L.	2	Annual	Introducida	Clorosis y entrenudos cortos
<i>Trifolium repens</i> L.	1	Perenne	Introducida	Clorosis
<i>Galega officinalis</i> ,L.	26	Perenne	Introducida	Clorosis y entrenudos cortos
<i>Erysimum officinale</i> L.	1	Annual	Introducida	Clorosis y crecimiento desuniforme
<i>Vicia sativa</i> L.	1	Annual	Introducida	Clorosis
<i>Geranium berteroanum</i> Colla	1	Annual	Nativa	Clorosis
<i>Melilotus indicus</i> (L.) All.	1	Perenne	Introducida	Clorosis
<i>Erodium cicutarium</i> (L.) L'Hér.	1	Annual	Introducida	Clorosis
<i>Cynara cardunculus</i> L.	2	Perenne	Introducida	Clorosis
<i>Mentha pulegium</i> L.	1	Perenne	Introducida	Clorosis
<i>Conyza bonariensis</i> (L.) Cronquist	2	Annual	Introducida	Clorosis, entrenudos cortos y crecimiento desuniforme
<i>Sonchus oleraceus</i> (L.) L.	2	Annual	Introducida	Clorosis, entrenudos cortos y hojas rojizas
<i>Cestrum parqui</i> (Lam.) L'Hér.	3	Annual	Introducida	Clorosis
<i>Senecio vulgaris</i> L.	2	Annual	Introducida	Clorosis y entrenudos cortos
<i>Baccharis glutinosa</i> Pers.	1	Annual	Introducida	Clorosis
<i>Juncus tenuis</i> willd.	2	Perenne	Introducida	Clorosis
<i>Beta vulgaris</i> L.	2	Annual	Introducida	Clorosis y entrenudos cortos
<i>Acacia caven</i> (Molina) Molina	1	Perenne	Nativa	Clorosis
<i>Crepis vesicaria</i> L.	2	Annual	Introducida	Entrenudos cortos y crecimiento desuniforme



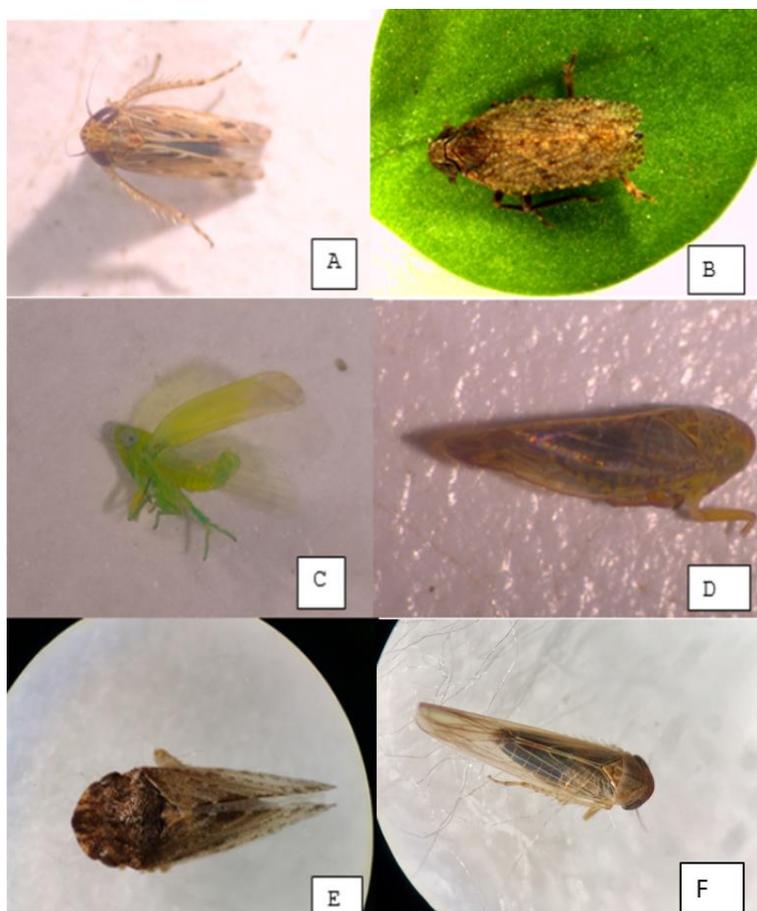
**Figura 2.** Síntomas en plantas colectadas en terreno. A) *Crepis vesicaria* con entrenudos cortos; B) *Conyza bonariensis* con crecimiento desuniforme, fasciación y entrenudos cortos; C) *Galega officinalis* con hojas cloróticas; D) *Rubus ulmifolius* con hojas rojizas; E) *Galega officinalis* con clorosis y necrosis en las hojas; F) *Sonchus oleraceus* con hojas rojizas.

### Captura e identificación de los insectos

Los 102 individuos capturados, corresponden al Orden Hemíptera y, a partir de sus características morfológicas, se pudieron agrupar en las especies detalladas en Cuadro 2 y cuyas fotografías correspondientes se observan en la Figura 3.

**Cuadro 2.** Especies capturadas en la plantación de frutillas y número de individuos por especie.

Suborden	Familia	Género	Especie	Nº de individuos
<i>Auchenorrhyncha</i>	<i>Cicadellidae</i>	<i>Amplicephalus</i>	<i>curtulus</i>	15
<i>Auchenorrhyncha</i>	<i>Cixiidae</i>	<i>Cixiosoma</i>	sp.	9
<i>Auchenorrhyncha</i>	<i>Cicadellidae</i>	<i>Xerophloea</i>	<i>viridis</i>	1
<i>Auchenorrhyncha</i>	<i>Cicadellidae</i>	<i>Empoasca</i>	sp.	74
<i>Auchenorrhyncha</i>	<i>Cicadellidae</i>	<i>Paratanus</i>	<i>exitiosus</i>	1
<i>Auchenorrhyncha</i>	<i>Cicadellidae</i>	<i>Balcluta</i>	sp.	2



**Figura 3.** Especies de insectos capturados. A) *Amplicephalus curtulus* Linnavuori & De Long; B) *Cixiosoma* sp.; C) *Empoasca* sp. D) *Paratanus exitiosus* (Beamer, 1943); E) *Xerophloea viridis* Fabricius; F) *Balclutha* sp.

### Identificación molecular de los insectos

De acuerdo con lo propuesto por Li *et al.* (2019), si las secuencias de dos individuos tienen una diferencia de identidad nucleotídica en el gen *cytC* menor o igual al 2%, ambos corresponderían a la misma especie de insecto. En la casi totalidad de los individuos colectados en Chile, el delta observado es superior al 2%. El cuadro 3 muestra los porcentajes de identidad nucleotídica de las secuencias del gen *cytC* de los individuos identificados morfológicamente. Solo en el caso de *Xerophloea viridis* la identificación morfológica ha podido ser corroborada por la molecular. En los otros casos, solo se pudo averiguar el nombre de la especie de insecto más cercana a la colectada en este trabajo, esto se debe a la escasa información genética de la entomofauna chilena disponible en las bases genéticas públicas.

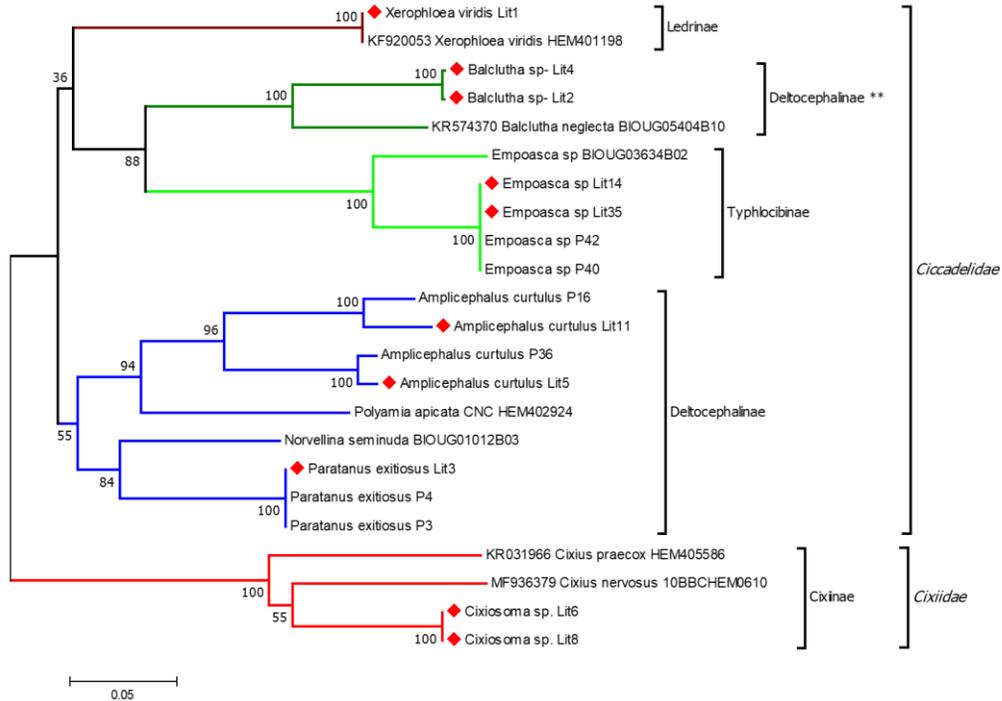
**Cuadro 3.** Resultado de identidad nucleotídica de insectos a través de la comparación de secuencias del gen *cytC* en el programa Blast (Basic Local Alignment Search Tool)

Identificación morfológica	Especie más cercana en genbank	% Identidad nucleotídica
<i>Amplicephalus curtulus</i>	<i>Polyamia apicata</i>	83,7
<i>Balcluta</i> sp.	<i>Balclutha neglecta</i>	88,4
<i>Cixiosoma</i> sp.	<i>Cixius nervosus</i>	87,5
<i>Empoasca</i> sp.	<i>Empoasca</i> sp.	90,3
<i>Paratanus exitiosus</i>	<i>Norvellina seminuda</i>	86,7
<i>Xerophloea viridis</i>	<i>Xerophloea viridis</i>	99,8

Se construyó también un árbol filogenético, incluyendo las secuencias generadas durante este trabajo, las correspondientes a las especies de insectos más cercanas a las nuestras y otras disponibles en la base de datos del Laboratorio de Fitovirología. A través de este árbol filogenético (Figura 4) *Empoasca* sp., *Amplicephalus curtulus* y *Paratanus exitiosus*, se observa una correlación entre la identificación morfológica con el análisis molecular, principalmente porque estas eran especies que ya se encontraban en la colección del Laboratorio de Fitovirología (las referencias llevan una letra “P” antes de un número, en el árbol). Como se mencionó anteriormente, la escasa información genética disponible de la entomofauna chilena, no permite obtener relaciones filogenéticas más cercanas, por lo que tanto las especies de referencia *Polyamia apicata* y *Norvellina seminuda* aparecen muy alejadas de las especies chilenas. La otra situación que se observa es la de insectos pertenecientes a los géneros *Balclutha* sp. y *Cixiosoma* sp. (Clasificado morfológicamente por los drs. Alma y Campodónico), para los cuales no hay informaciones genéticas disponibles tampoco en el Laboratorio de Fitovirología. El bajo porcentaje de identidad de estos individuos con las especies de referencia presente en genbank sugiere que estamos frente a dos

nuevas especies de insectos.

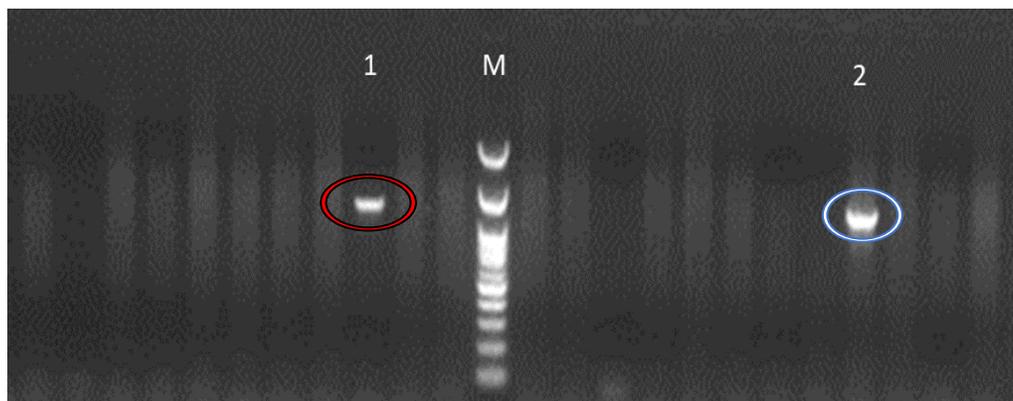
**Figura 4:** Árbol filogenético de las secuencias de 650 nucleótidos correspondientes al gen *cytC* de diferentes especies de insectos capturados en terreno y otras especies de



referencia. Se identifican dos familias: Cixiidae y Cicadellidae y las diferentes subfamilias a las que pertenecen los individuos colectados durante este trabajo identificado con un rombo rojo.

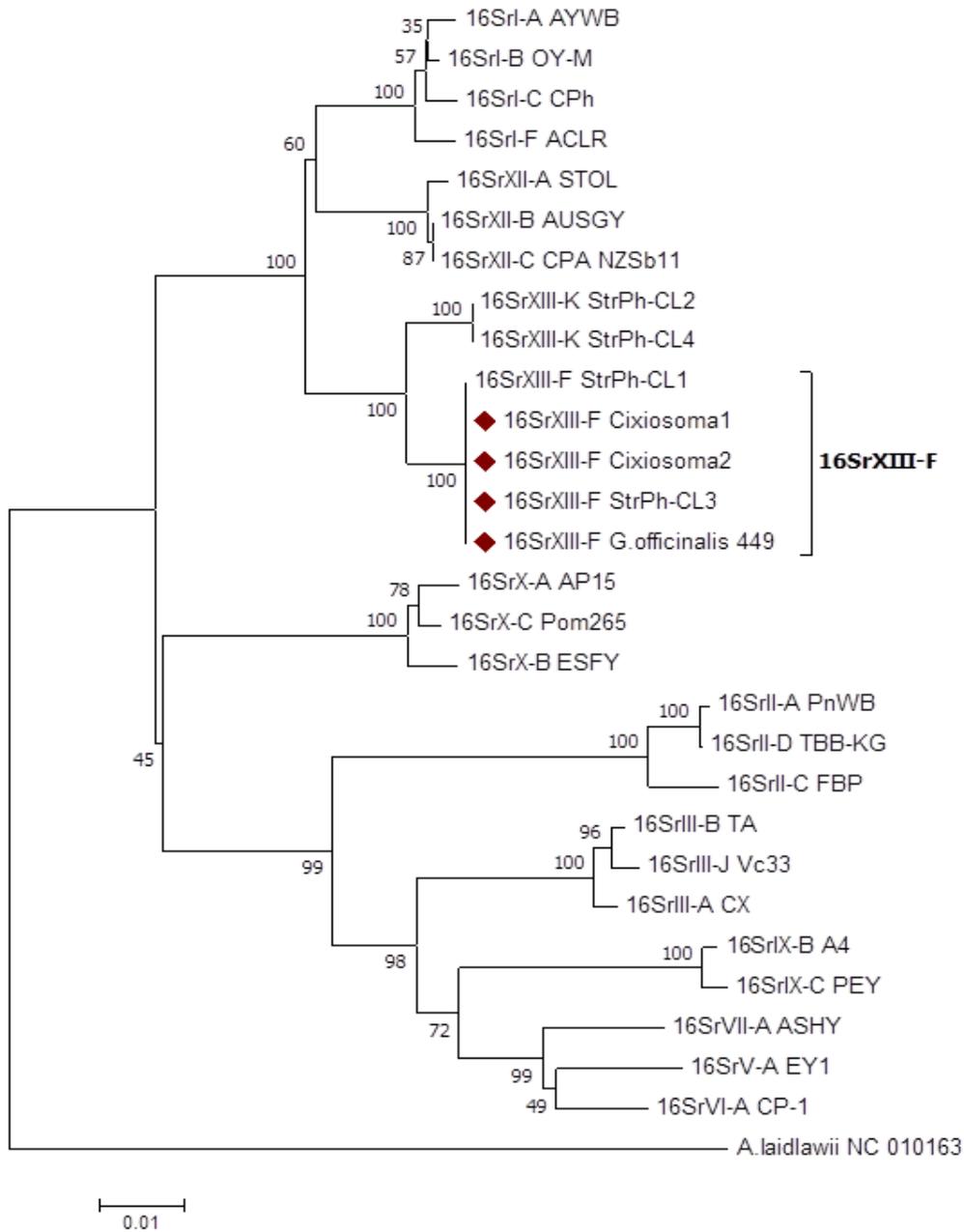
### Detección e identificación de los fitoplasmas encontrados en malezas e insectos

Una vez extraído el ADN de las 80 muestras de plantas colectadas, se realizaron los PCRs directo y anidado para la detección de fitoplasmas. La electroforesis en gel de agarosa mostró el producto de amplificación esperado de 1250 pb sólo en una muestra de *Galega officinalis*, código Hort 449, colectada durante el muestreo N°7 del 14 de febrero 2020 (Figura 5).



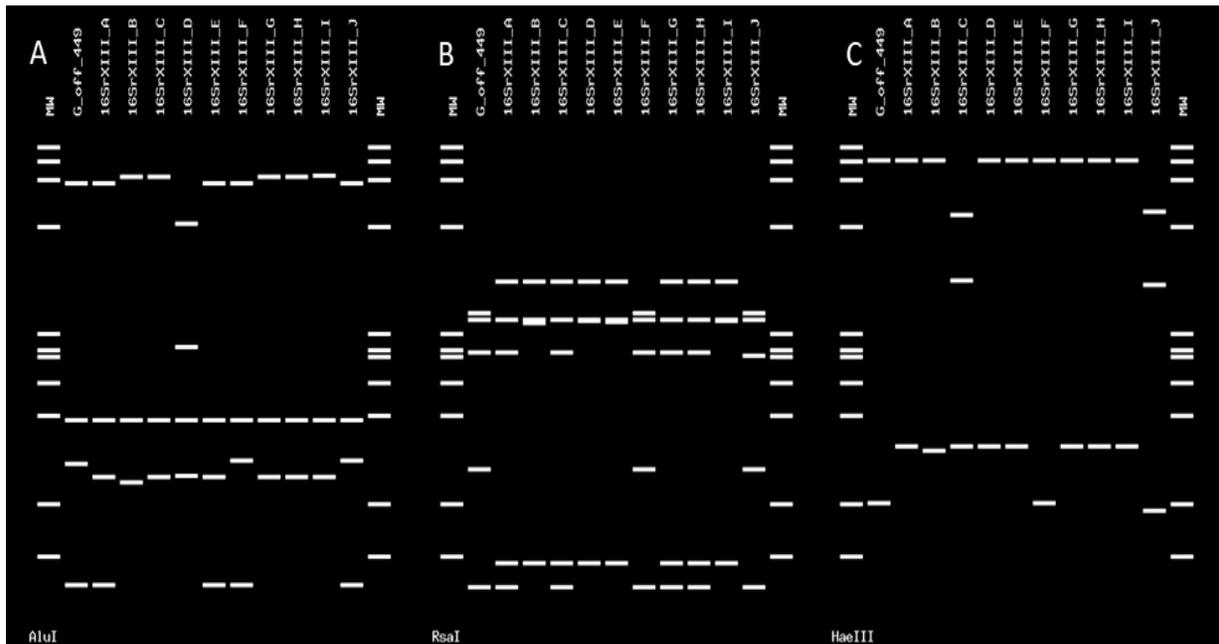
**Figura 5.** Visualización, a través de electroforesis en gel de agarosa al 2%, del producto de amplificación obtenido por PCR anidada con los partidores R16F2n/R2 (gen 16S rRNA) de una muestra de *G. officinalis*, Hort 449. M) marcador de peso molecular 100 pb; 1) muestra Hort 449; 2) control positivo correspondiente a una muestra de planta de frutilla positiva al fitoplasma 16SRXIII-F presente en el predio.

El producto de amplificación obtenidos con la muestra de *G. officinalis* Hort 449, se secuenció y con la secuencia se realizó un análisis BLAST que indicó el 100% de identidad nucleotídica con un fitoplasma pertenecientes al grupo ribosomal 16SrXIII. Por otro lado, la detección de fitoplasmas en los extractos de ADN de los insectos entregó resultados positivos en nueve especímenes de la especie *Cixiosoma* sp. Los fragmentos de amplificación fueron secuenciados y analizados mediante comparación en BLASTn, entregando una identidad nucleotídica de 100% con la referencia 'Fragaria x ananassa' phyllody phytoplasma clone CL1(número de acceso MH939191) para los nueve aislados. El árbol filogenético se construyó utilizando las secuencias del gen 16S rRNA casi completas de los fitoplasmas detectados en el campo de frutillas, tanto en el hospedero principal '*Fragaria x ananassa*', como en *Galega officinalis* y en *Cixiosoma* sp. (Figura 6). Todos los aislados se reúnen en el mismo grupo filogenético.



**Figura 6:** Árbol filogenético de las secuencias de 1.250 nucleótidos correspondientes al gen 16S rRNA de los diferentes grupos y subgrupos de fitoplasmas identificados en plantas e insectos. El fitoplasma 16SrXIII-F (Str-Ph-CL3), identificado en plantas de frutillas, también se encontró en nueve individuos de insectos pertenecientes a *Cixiosoma* sp. (*Cixiosoma* 1 y 2), como en una muestra de *G. officinalis* (*G. officinalis* 449). Las secuencias obtenidas durante este trabajo están marcadas con un rombo rojo.

Para completar la identificación de los fitoplasmas a nivel de subgrupo ribosomal, fue necesario realizar un RFLP *in silico*, lo que permitió comparar los patrones de los perfiles de restricción de nuestros aislados con los de las cepas conocidas pertenecientes al grupo 16SrXIII presentes en genbank. La Figura 7 muestra un RFLP *in silico* realizado en el programa online *iPhyClassifier*, donde se utilizó sólo la secuencia de *G. officinalis* como representativa del estudio, ya que es idéntica a las obtenidas en insectos. En el RFLP se puede observar que la muestra G\_off\_449 muestra un patrón de bandas idéntico al subgrupo ribosomal 16SrXIII-F, confirmando así la presencia de este fitoplasma de frutilla en galega y en los cíxidos colectados.



**Figura 7.** Perfiles de RFLP *in silico* de la cepa del grupo ribosomal 16SrXIII detectado en la muestra de planta Hort 449 correspondiente a *G. officinalis* y a los insectos positivos. A) Perfiles de digestión generados por la enzima *AluI*. B) Perfiles de digestión generados por la enzima *RsaI*. C) Perfiles de digestión generados por la enzima *HaeIII*. G\_off\_449 corresponde a la muestra Hort 449 de *G. officinalis* amplificadas por nested-PCR con R16F2n/R2 del gen 16S rRNA (1250 pb). MM: marcador molecular PhiX174 digerido con *HaeIII*. Tamaño de los fragmentos (bp) de arriba hacia abajo: 1.353, 1.078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118, y 72. Fitoplasmas utilizados como referencia: 16SrXIII-A, Mexican periwinkle virescence (MPV) ‘*Ca. P. hispanicum*’ (Accession Number: AF248960); 16SrXIII-B, Strawberry green petal (STRAWB2) (Accession Number: U96616); 16SrXIII-C, Chinaberry yellows (CBY1) (Accession Number: AF495882); 16SrXIII-D, Mexican potato purple top (SINPV) (Accession Number: FJ914647); 16SrXIII-E, Papaya apical curl necrosis (PACN) (Accession Number: EU719111); 16SrXIII-F, Strawberry red leaf (Accession Number: KJ921641); 16SrXIII-G Chinaberry yellowing (ChTY) ‘*Ca. P. meliae*’ (Accession Number: KU850940); 16SrXIII-H Broccoli stunt phytoplasma (Accession Number: JX626329); 16SrXIII-I Mexican periwinkle virescence phytoplasma (Accession Number: KT444664); 16SrXIII-J, Strawberry phylloid fruit (SFP-Br2) (Accession Number: EU719108).

## DISCUSIÓN

Respecto de los resultados obtenidos a partir de este estudio, resulta claro indicar que la mayoría de los síntomas observados en plantas no frutilla, no necesariamente son asociable exclusivamente a la presencia de fitoplasmas. La senescencia de las plantas, la falta de agua y nutrientes, el exceso de calor y/o de irradiación solar, el uso de herbicidas y la incidencia de agentes bióticos de enfermedad, podrían haber sido los responsables de la sintomatología observada. La única planta positiva al fitoplasma 16SrXIII-F (el mismo que fue detectado con anterioridad en las plantas de frutillas de dicho predio), fue *G. officinalis*, la cual presentaba una clorosis generalizada en las hojas, un cuadro sintomatológico que también podría atribuirse, por ejemplo, a deficiencia de nitrógeno o de hierro (Hanson, 2006); A diferencia de las especies cultivadas, no se dispone de informaciones suficientes acerca del comportamiento agronómico de las plantas espontáneas en terreno. No siendo estas una fuente de alimento, generalmente solo se intenta eliminarlas, sobre todo si se trata de malezas. Entonces su ciclo biológico, está sujeto a la disponibilidad de alimento y agua ofrecidos por el ambiente y, cuando ambos escasean, pueden presentar síntomas confundibles con los que causan los fitoplasmas. Es necesario agregar, por otro lado, que no es poco común encontrar plantas espontáneas asintomáticas pero positivas a fitoplasmas (Caudwell 1983).

La alta densidad de malezas presentes en el predio de frutilla, presuponía un rol importante de estas como reservorio de fitoplasmas. El haber encontrado solo una planta positiva, parece indicar que no es así, sin embargo hay varios factores a evaluar y no todos han sido considerados en este estudio, debido a la falta de recursos y de tiempo: el muestreo de plantas se realizó solo durante 6 meses (desde final de agosto 2019 hasta el 3 marzo 2020) y no durante todo el año; las plantas se colectaron a no más de 10 metros desde el borde del huerto de frutilla; no se incluyeron otros predios para ampliar el área de estudio. Además, la sequía ha reducido drásticamente la variabilidad de malezas presentes en la zona externa al predio. No obstante, solo hecho el haber encontrado solo una especie de maleza positiva a fitoplasmas es un muy buen resultado ya que se trata de una planta, que es una especie perenne herbácea, es dotada de una vigorosa y profunda raíz pivotante y se reproduce muy abundantemente por semilla (Ormeño, 2005), y a pesar de ser una especie no invasiva, debido a su biología es muy difícil de erradicar. Por lo tanto, la galega es una especie vegetal que sin duda juega un rol muy importante como reservorio de fitoplasmas, así como se indica en otro estudio epidemiológico realizado en Chile en la vid, a través del cual se pudo confirmar que *G. officinalis* es hospedera del fitoplasma perteneciente al subgrupo ribosomal 16SrVII-A, mientras otras especies de malezas, siempre de ciclo perenne, como *Convolvulus arvensis* L. y *Malva* spp. han resultado positivas respectivamente a los fitoplasmas 16SrXII-A y 16SrIII-J. En el mismo estudio también se

encontraron malezas de ciclo anual como *Polygonum aviculare* L., positiva al fitoplasma 16SrI-B y *Brassica rapa* L. positiva a 16SrIII-J, relevantes en su rol de hospederas secundarias de fitoplasmas (González *et al.*, 2008; Longone *et al.*, 2011; Quiroga *et al.*, 2020).

Entre las especies de insectos capturadas, solo algunos de los individuos pertenecientes al género *Cixiosoma* resultaron positivos al fitoplasma 16SrXIII-F. Esto nos permite concluir que el cíxido es un vector potencial del fitoplasma. La literatura indica que algunas especies de insectos son capaces de adquirir el patógeno, pero no pueden transmitirlo. Entonces es necesario realizar las pruebas de transmisión con *Cixiosoma* sp. para corroborar si efectivamente es o no vector del fitoplasma 16SrXIII-F. Para averiguar si hay otras especies de insectos potenciales vectores involucrados en el ciclo epidemiológico, al igual de como se ha indicado para las plantas espontáneas, es necesario ampliar el periodo de captura incluyendo los otros 6 meses del año. Las características morfológicas y moleculares del insecto no permitieron establecer a cuál especie pertenece. El Dr. Campodónico afirma que muy probablemente se esté frente a una nueva especie de cíxido. El mismo entomólogo indica que en Chile (y en Sudamérica en general) es escasa la información acerca de los cíxidos y de otras familias de hemípteros tales como cicadélidos, delfácidos y psílidos, entre otros, ya que no son considerados insectos plaga, por lo tanto, no es insólito encontrar dificultad cuando se deben identificar a nivel de especie. La clasificación de estos insectos es prioritaria porque, como indican los trabajos epidemiológicos realizados en Chile durante la última década, estas especies causan un daño relevante a los cultivos en forma indirecta, o sea, transmitiendo y diseminando a los fitoplasmas (Longone *et al.*, 2011; Quiroga *et al.*, 2020)

En general las especies de insectos capturadas cumplen su ciclo de vida en las malezas y solo esporádicamente visitan las plantas de frutilla. Aunque esto no está del todo claro en el caso de *Cixiosoma* sp. Lo que se ha podido averiguar es que, durante los seis meses de salidas a terreno, el porcentaje más alto de capturas de insectos (aproximadamente 70%) se ha registrado al principio, desde final de agosto hasta el mes de enero, coincidentemente con la mayor disponibilidad de plantas de correhuela en terreno. La menor cantidad de *C. arvensis* podría explicar la disminución de las capturas de insectos. El mismo comportamiento se ha visto con el cicadélido *Bergallia valdiviana* Berg 1881, que se alimenta principalmente en *C. arvensis* y *P. aviculare* en la temporada de primavera-verano (Quiroga *et al.*, 2015).

El otro fitoplasma, perteneciente al subgrupo ribosomal 16SrXIII-K, encontrado en frutilla en trabajos anteriores (Cui *et al.*, 2019b), no se detectó en ninguna de las muestras analizadas en este trabajo. Esto parece indicar que no es el subgrupo prevalente en frutilla.

Los fitoplasmas se han diseminado en diferentes áreas del mundo, con algunos grupos presente solo en un continente o incluso en una región geográfica específica (Gasparich, 2010). Al grupo 16SrXIII pertenecen 7 subgrupos ribosomales (de A a G), distribuidos en el continente americano, en papa (*Solanum tuberosum* L.), brócoli (*Brassica oleracea* L.) y papaya (*Carica papaya* L.), entre otras, y en países cuales Brasil, Argentina, Bolivia, Chile y Uruguay. Además, el fitoplasmas asociado a la enfermedad denominada “Mexican periwinkle virescence”, se ha detectado también en México y Estados Unidos y no solamente en Sudamérica (Jomantiene *et al.*, 1998; Santos-Cervantes *et al.*, 2010; Eckstein *et al.*, 2013; Melo *et al.*, 2013; Fernández *et al.*, 2015; Bertaccini, 2022). En específico el 16SrXIII-F fue detectado por primera vez en Argentina en huertos de frutilla de las provincias de Tucumán y Corrientes. La enfermedad se denominó “Strawberry red leaf” (Fernández *et al.*, 2015). Mientras en Brasil la enfermedad se denominó “Strawberry fruit phyllody” (Accession Number EU719109), con síntomas muchos más parecidos a los observados en Chile. La identidad nucleotídica de las secuencias nucleotídicas del gen 16S rRNA de las cepas presentes en Chile, Argentina y Brasil fue 99%, o sea, se trata del mismo fitoplasma en los tres países. En base a esta información el fitoplasma 16SrXIII-F podría ser originario del continente americano. Pero el análisis filogenético entre los diferentes grupos ribosomales indica que hay un origen común entre el 16SrXIII y los grupos 16SrXII y 16SrI (Santos-Cervantes *et al.*, 2010; Pérez-López *et al.*, 2016). En línea general, la cercanía filogenética del grupo 16SrXIII con el 16SrI no es sorprendente, siendo este último el que presenta la mayor diversidad genética y está distribuido en todo el mundo y, a su vez, es estrechamente relacionado con el grupo 16SrXII (Gundersen y Lee, 1996; Lee *et al.*, 2000; Wei *et al.*, 2011). La relación filogenética cercana entre los tres grupos ribosomales indicaría una coexistencia prolongada y sucesiva separación causada principalmente por la especificidad entre los diferentes grupos ribosomales y sus vectores. Las dos argumentaciones anteriores son contrastantes y se mantiene abierto el debate acerca del origen geográfico del grupo 16SrXIII. Las principales preguntas que buscan respuesta son: ¿dónde ocurrió la coexistencia? ¿en América o en otro continente? Y si es otro continente ¿Por qué el grupo 16SrXIII está siendo detectado solo en América? si en cambio la coexistencia se originó en América ¿Por qué los grupos 16SrI y 16SrXII, son pocos prevalentes en América? Impulsar la investigación sobre fitoplasmas en el continente americano es la única manera para obtener respuestas a estas interrogantes.

La presencia del fitoplasma 16SrXIII-F en Chile no parece reducirse solo a la frutilla, sino que también ha sido detectado en plantas de cítricos con amarilleces generalizadas, escobas de brujas y hojas filiformes. Esta ha sido la primera detección en el mundo del 16SrXIII-F en cítricos. Las dos plantas infectadas se encontraron en la región de O’Higgins, específicamente mandarino (*Citrus reticulata* Orri) en Peumo y en naranjo (*Citrus x sinensis* Fukumoto) en Pichidegua. En estas dos localidades también hay plantaciones de frutilla positivos, por lo tanto, es aún más plausible la hipótesis de la

presencia de un vector del fitoplasma en el territorio nacional (Cui *et al.*, 2019a, b; Quiroga *et al.*, 2022). Adicionalmente el mismo fitoplasma ha sido detectado en calafate (*Berberis microphylla* G. Forst.), un arbusto de la familia *Berberidaceae*, nativo de la Patagonia chilena y argentina (Varas *et al.*, 2013; Madariaga y Ramírez, 2019).

En cuanto al control de la enfermedad, es aconsejable eliminar no solo las plantas de frutilla con síntomas, sino que también todas las plantas de galega presentes en el huerto y alrededor de este. Para conocer si otras especies vegetales albergan al fitoplasma, es necesario ampliar el periodo de muestreo de plantas no frutilla. Lo mismo se debe hacer con la captura de los insectos, con el fin de establecer en cual período del año es más abundante el *Cixiosoma* sp. y así poder entregar indicaciones precisas a los productores para eliminar el cíxido y, en consecuencia, frenar la diseminación del fitoplasma. Esto siempre cuando, se realicen previamente las pruebas de transmisión, y se determine que *Cixiosoma* sp. es vector del fitoplasma 16SrXIII-F.

En base a los resultados obtenidos a través de este estudio, se puede afirmar que la hipótesis planteada es correcta en cuanto el fitoplasma 16SrXIII-F se encontró tanto en una especie de planta espontánea (*G. officinalis*) como en una especie de insecto (*Cixiosoma* sp.) que, por pertenecer a la familia *Cixiidae*, presenta una alta probabilidad de matricularse como vector del patógeno.

## CONCLUSIONES

A través de este trabajo se obtuvieron los siguientes resultados:

Se confirma la presencia de fitoplasma 16SrXIII-F en la maleza *G. officinalis* y en el cíxido *Cixiosoma* sp siendo la primera información en el mundo. La galega es reservorio del patógeno y el insecto es un potencial vector del fitoplasma. Se deben realizar las pruebas de transmisión para corroborar si el insecto es o no un vector.

La identificación molecular de los insectos capturados indica que no hay informaciones disponibles en genbank y es necesario retroalimentar el banco genético con nuevas clasificaciones.

Con los datos disponibles hasta ahora, para el control del fitoplasma, se aconseja eliminar la galega dentro y alrededor de los predios de frutilla, debido a que es una planta hospedera secundaria del fitoplasma.

Para el futuro:

Una proyección de esta investigación consiste en la necesidad de ampliar el monitoreo de plantas no frutilla e insectos durante todo el año, incluyendo también nuevas áreas de producción de frutilla.

## BIBLIOGRAFÍA

- Bai, X., (2004). Insect transmitted plant pathogenic mollicutes, *Spiroplasma kunkelii* and aster yellows witches'-broom phytoplasma: from structural genomics to functional genomics. The Ohio State University. 232 p.
- Bañados, M., Bonomelli, C., Figueroa, R., Gambardella, M., Zaviezo, T., Ávila, T., Sallato, B., Cordovez, G., Villagra, D., Grez, J. (2015). Manual del cultivo de frambuesas y frutillas en Chile. Pontificia universidad católica de Chile. Santiago, Chile. 65p.
- Bertaccini, A.,(2007). Phytoplasmas: diversity, taxonomy, and epidemiology. *Frontiers in Bioscience* 12. 673-689p.
- Bertaccini, A. y Lee I.-M.,( 2018). Phytoplasmas: An update. En: Rao GP, Bertaccini A, Fiore N, Liefing LW (Eds.), *Phytoplasmas: Plant pathogenich bacteria – I. Characterisation and epidemiology of phytoplasmas-associated diseases*. Springer. 345 p.
- Bertaccini, A. (2022). Plants and Phytoplasmas: When Bacteria Modify Plants. *Plants* 11: 1425. <https://doi.org/10.3390/plants11111425>
- Bertaccini, A., Arocha-Rosete, Y., Contaldo, N., Duduk, B., Fiore, N., Montano, E.G., Kube, M., Kuo, C.-H., Martini, M., Oshima, K., Quaglino, F., Schneider, B., Wei, W., Zamorano, A. (2022). Revision of the ‘*Candidatus* Phytoplasma’ species description guidelines. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 72:005353, DOI 10.1099/ijsem.0.005353
- Bosco, D., Tedeschi, R., (2013). Insect vector transmission assays, *Phytoplasma*. Springer, pp. 73-85 p.
- Botti, S., Bertaccini A. (2006); *Phytoplasma* infection through seed transmission: further observations. In *Abstracts, 16th International Organization of Mycoplasma Conference Cambridge*. 76 p.
- Costanzo, S., (2012). New Pest Response Guidelines. En: Robert E. Davis (Ed.), *Selected ‘Candidatus Phytoplasma spp.’ of Apple, Grape and Peach*. The U.S. Department of Agriculture. 210 p.
- Cui, W., Quiroga, N., Bertaccini, A., Zamorano, A., Fiore, N. (2019)a. Use of *12p* and *36p* genes as molecular markers in support of subgroup identification of two 16SrXIII phytoplasmas associated with strawberry phyllody in Chile. *Phytopathogenic Mollicutes 2019 (9)*: 89p.
- Cui, W., Quiroga, N., Curkovic, T., Zamorano, A., Fiore, N., (2019b), Detection and identification of 16SrXIII-F and a novel 16SrXIII phytoplasma subgroups associated with strawberry phyllody in Chile. *European Journal of Plant Pathology*. 155:1039–1046 p.
- Della Giustina, W. (1989). Homoptères Cicadellidae. Vol III (suplément). In: *Faune de France 73p*.edited by FFSSN-INRA, Paris. 350 p.
- Eckstein, B., Barbosa, J.C., Kreyci, P.F., Canale, M.C., Brunelli, K.R., and Bedendo, I.P. (2013). Broccoli stunt, a new disease in broccoli plants associated with three distinct phytoplasma groups in Brazil. *Journal of Phytopathology*. 161:442-444p.
- Espinoza, N. (2017). Guía visual para identificar malezas en terreno. Temuco, Chile. 266 pp.

- Fernández, F., Meneguzzi, N., Guzman, F., Kirschbaum, D., Conci, V., Nome, C., Conci, L. (2015). Detection and identification of a novel 16SrXIII subgroup phytoplasma associated with strawberry red leaf disease in Argentina. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 65: 1-7.
- Gasparich, G., (2010). Spiroplasmas and phytoplasmas: microbes associated with plant hosts. *Biologicals* 38: 193-203.
- González, F., Paltrinieri, S., Calari, A., Bertaccini, A., Alma, A., Picciau, L., Araya, J., Fiore, N. (2008). Phytoplasmas associated with grapevine in Chile: Potential insect vectors and reservoirs. In Proceedings of the II International Phytoplasma Workshop, La Habana, Cuba, 22–26 September 2008.
- Gundersen, D.E., Lee, M.Y. (1996). Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primers pairs. *Phytopathologia Mediterranea* 35: 144-151.
- Hall, T.A. (1999). BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
- Hanson, E.J. (2006). Nitrogen fertilization of highbush blueberry. (pp. 547-551). En: VIII: International Symposium on Vaccinium Culture (8a, 3-8 mayo 2004, Sevilla, España y Oeiras, Portugal). Trabajo presentado como ponencia. Sevilla, España: Leuven, Belgium. 601pp.
- Hogenhout S. A., Oshima K., Ammar el-D., Kakizawa S., Kingdom H. N., Namba S. (2008). *Phytoplasmas: bacteria that manipulate plants and insects. Molecular Plant Pathology* 9: 403–423.
- Jomantiene, R., Davis, R.E., Maas, J., Dally, E.L. (1998). Classification of new phytoplasmas associated with diseases of strawberry in Florida, based on analysis of 16S rRNA and ribosomal protein gene operon sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48: 269–277.
- Lee, I.M., Davis, R.E., Gundersen, D.E. (2000). Phytoplasma: Phytopathogenic Mollicutes. *Annual Review Microbiology* 54: 221-255.
- Lee, I.-M., Gundersen-Rindal, D.E., Davis, R.E., Bartoszyk, I.M. 1998. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 48: 1153–1169.
- Leiva, C., Gajardo, G., Retamal, M., Torres C. (2017). Atlas del modelo de adaptación al cambio climático por medio de la zonificación de aptitud productiva de especies hortofrutícolas priorizadas en la Región del Biobío. Ed. Publicación CIREN N°219, Santiago. Chile. 245 pp.
- 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: S91-S92.
- Madariaga, M., Ramírez, I. (2019). Identification of a phytoplasma associated with witches' broom symptoms in calafate (*Berberis microphylla* G. Forst.). *Chilean Journal of Agricultural Research* 79: 493–498.
- Melo, L., Silva, E., Flores, D., Ventura, J., Costa, H., and Bedendo, I. (2013). A phytoplasma representative of a new subgroup, 16SrXIII-E, associated with Papaya apical curl necrosis. *European Journal of Plant Pathology* 137: 445-450.
- Ormeño, J. (2005). *Malezas de huertos frutales y vides: Biología y control*. Colección libros INIA N°17, Salviat Impresores, Santiago de Chile, 113 pp.
- Pérez-López, E., Luna-Rodríguez, M., Olivier, CY., Dumonceaux, TJ. (2016). The underestimated diversity of phytoplasmas in Latin America. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 66: 492-513.

Quiroga, N., González, X., Zamorano, A., Pino, A. M., Picciau, L., Alma, A., Paltrinieri, S., Contaldo, N., Bertaccini, A., Fiore, N. (2015). Transmission of 16SrIII-J phytoplasma by *Bergallia valdiviana* Berg 1881 leafhopper. *Phytopathogenic Mollicutes* 5(1-S): S47-S48.

Quiroga, N., Gamboa, C., Soto, D., Pino, A.M., Zamorano, A., Campodonico, J., Alma, A., Bertaccini, A., Fiore, N. (2020). Update and new epidemiological aspects about Grapevine Yellows in Chile. *Pathogens* 9: 933, doi:10.3390/pathogens9110933

Quiroga, N., Gamboa, C., Medina, G., Contaldo, N., Torres, F., Bertaccini, A., Zamorano, A., Fiore, N. (2022). Survey for ‘*Candidatus Liberibacter*’ and ‘*Candidatus Phytoplasma*’ in Citrus in Chile. *Pathogens* 11: 48. <https://doi.org/10.3390/pathogens11010048>

Rebolledo, A. (2016). Prospección y caracterización molecular de fitoplasmas en frutales de carozos en Chile (en línea). Tesis magister en Ciencias Agronómicas. Santiago, Chile: Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. 11pp. Recuperado en < [repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/151038/Prospeccion-y-caracterizacion-molecular-de-fitoplasmas-en-frutales-de-carozo-en-Chile.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/151038/Prospeccion-y-caracterizacion-molecular-de-fitoplasmas-en-frutales-de-carozo-en-Chile.pdf?sequence=1&isAllowed=y) > consultado el 26 de Diciembre 2019.

Ribaut, H. 1936. Homopteres Auchenorhynques I (Typhlocyidae) in faune de France. 31: 1-231p

Ribaut, H. (1952). Bulletin de la Société d’histoire naturelle de Toulouse, Toulouse, 88 p.

Santos-Cervantes, M.E., Chávez-Medina, J., Acosta-Pardini, J., Flores-Zamora, G., Mendez-Lozano, J., and Leyva-Lopez, N.E. (2010). *Genetic diversity and geographical distribution of phytoplasmas associated with potato purple top disease in Mexico*. *Plant Disease* 94: 388-395.

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

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725–2729.

Varas, B., Castro, M.H., Rodríguez, R., Von Baer, D., Mardones, C., Hinrichsen, P. (2013). Identification and characterization of microsatellites from calafate (*Berberis microphylla*, Berberidaceae). *Applications in Plant Sciences* 1 (7): 1200003. <https://doi.org/10.3732/apps.1200003>

Wei, W., Cai, H., Jiang, Y., Lee, I.-M., Davis, R. E., Ding, Y., Yuan, E., Chen, H. & Zhao, Y. (2011). A new phytoplasma associated with little leaf disease in azalea: multilocus sequence characterization reveals a distinct lineage within the aster yellows phytoplasma group. *Annals of Applied Biology* 158: 318–330.

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

Zhao, Y., Wei, W., Lee, I.-M., Shao, J., Suo, X., Davis, R.E. (2013). The *iPhyClassifier*, an interactive online tool for phytoplasma classification and taxonomic assignment. *Methods in Molecular Biology* 938: 329–338.