



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS

ESCUELA DE POSTGRADO

ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DEL FITOPLASMA 16SrXIII-F ASOCIADO A LA FILODIA DE LA FRUTILLA EN CHILE

Tesis para optar al Título de Ingeniera Agrónoma y al Grado de Magíster en Ciencias
Agropecuarias

VALENTINA ISABEL MUÑOZ QUIROZ

Director de Tesis
Alan Zamorano

Co-Director de Tesis
Nicola Fiore

Profesores consejeros
Erwin Aballay
Gabriela Lankin

Profesora Colaboradora
Weier Cui

SANTIAGO – CHILE 2022

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE POSTGRADO

**ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DEL FITOPLASMA 16SrXIII-F ASOCIADO A LA FILODIA
DE LA FRUTILLA EN CHILE**

Tesis presentada como parte de los requisitos para optar al Título Profesional de
Ingeniera Agrónoma y al Grado de Magíster en Ciencias Agropecuarias.

VALENTINA ISABEL MUÑOZ QUIROZ

DIRECTOR DE TESIS Alan Zamorano C. Bioquímico, Dr. Cs. Agr.	Calificaciones 6,9
CO-DIRECTOR DE TESIS Nicola Fiore Ingeniero Agrónomo, Dr. Cs. Agr.	7,0
PROFESORES CONSEJEROS Erwin Aballay E. Ingeniero Agrónomo, M. S. Ph. D.	7,0
Gabriela Lankin Ingeniero Agrónomo, Mg. Sc., Ph.D	7,0

Santiago, Chile
2022

A mis padres, Isabel y Hugo

AGRADECIMIENTOS

Quisiera comenzar agradeciendo a CONICYT por el financiamiento de la presente tesis a través del FONDECYT de Iniciación 2020 Nro.11200576: “*Epidemiological study of strawberry phyllody phytoplasmas in Chile*” adjudicado a la Dra. Weier Cui, el cual me permitió cursar mis estudios de posgrado en pandemia cuando todo se veía tan lejano.

A mi Shifu por su ardua dedicación durante todo el desarrollo de la tesis, enseñándome de todo y más a pesar de la barrera del idioma. Por siempre apartar un tiempo para resolver mis dudas y reexplicarme el “¿Pero cómo? Dónde?” y ¿Por qué? de las cosas, porque se puede ser tan curioso como un michi. Por permitirme conocer lugares en donde nunca imaginé estar, además del microscópico mundo de los fitoplasmas. Algunos envidiosos dirán que fui tu esclava, pero yo creo que realmente fui tu primera discípulo.

A mi director de tesis Don Alan, por tenderme una mano cuando todo se veía perdido y adoptarme en el laboratorio. Por creer en mí y darme la oportunidad de aprender y crecer como profesional y persona, pero principalmente por su cercanía y apoyo (disfrazado de presión a veces pero justo y necesario). A mi director de tesis Nicola Fiore, que a pesar de que nos vimos relativamente poco, su presencia siempre estuvo y por tener la revisiones de avances más rápidas del oeste. Al Dr. Juan Francisco Campodónico por su trabajo en el reconocimiento de especies. A Mauricio Estrada por recibirnos, guiarnos y colaborar desde la región de Magallanes. A mis profesores consejeros Gabriela y Erwin por dedicar su valioso tiempo en revisar mi escrito. A todo el equipo de laboratorio Coni, Claus, Camis, Liss, Tania y tesistas, por volverlo un hogar. Claramente no hubiese sido lo mismo sin ustedes. Mi cariño hacia ustedes no tiene nada que ver con las cosas ricas que siempre llevaban para comer.

A mis amigas Rosa, Dani y Javi, por acompañarme en todo este camino universitario, por el apoyo moral después de cada prueba, por las tardes de estudio, los almuerzos y las risas que nunca faltaron en todos los momentos compartidos.

A mis seres queridos, mi familia, que son bastantes pero ustedes saben perfectamente quienes son, por apoyarme de mil y una forma, por simplemente estar a pesar de que la comunicación no sea mi fuerte, ustedes siempre están en mis recuerdos. A Andrés (Andy) por la grata compañía y tranquilidad que siempre me entregas, por dejarme ser quien soy contigo, entenderme y quererme. A la Sra Cristina por recibirme en su casa como una más de su familia, por esa calidez que siempre me entregó en cada gesto estaré eternamente agradecida.

Finalmente, pero más importante, a mis padres Isabel y Hugo, por haberme permitido estudiar y soñar. Por entregar más de lo que se podía, con esa lucha diaria en donde abandonar no era opción a pesar de tanta dificultad y de lo duro que les ha tocado a lo largo de sus vidas. Por ser mi mayor apoyo en la vida y enseñarme a que lo esencial va más allá lo explicable. A donde sea que mire en el pasado, en el presente y ojalá en un extenso futuro siempre están apoyándome incondicionalmente. Con mención especial a mi mom, por enseñarme valores, a respetar, a querer y un sinfín de otras “cosas” que reflejan lo que hoy soy, porque las cosas más importantes en la vida no son cosas. Por traer a Miel y Toto a la casa. Por tanto cariño que siempre entregas sin esperar nada a cambio y porque sin duda lo mejor que me pudo haber pasado es que usted sea mi madre.

Por eso y más, Gracias!

ÍNDICE

Contenido

RESUMEN	8
ABSTRACT	9
INTRODUCCIÓN.....	10
OBJETIVOS.....	12
Objetivo general	12
Objetivos específicos.....	12
MATERIALES Y MÉTODOS	13
Ubicación de estudio	13
Material biológico	13
Manejo del experimento	13
Salidas a terreno	13
Actividades asociadas al objetivo específico 1	13
Actividades asociadas al objetivo específico 2	16
RESULTADOS	19
Salidas a terreno	19
Potenciales insectos vectores.....	19
Colecta e identificación general de muestras entomológicas.....	19
Detección de ' <i>Candidatus</i> Phytoplasma especies' mediante nested-PCR para el gen 16S rRNA	20
Análisis de secuencias de amplificaciones positivas del gen de la subunidad ribosomal 16Sr para identificación de fitoplasmas	21
Análisis de las secuencias del gen mitocondrial citocromo oxidasa I (COI)	22
Identificación morfológica y/o molecular específica de los potenciales insectos vectores del fitoplasma 16SrXIII-F	25
Superfamilia Fulgomorpha.....	25
Superfamilia Membracoidea (Cicadellidae).....	26
Superfamilia Psylloidea.....	28
Hospederos vegetales	30
Detección de ' <i>Candidatus</i> Phytoplasma' mediante nested-PCR para el gen 16S rRNA ..	32
Análisis de secuencias de amplificaciones del gen de la subunidad ribosomal 16Sr para identificación de fitoplasmas	32
Identificación de especies vegetales infectadas con fitoplasmas e información asociada a ellas.....	33
DISCUSIÓN.....	34
CONCLUSIÓN	37

LITERATURA CITADA.....	38
APÉNDICE	43

Índice de Cuadros

Cuadro 1. Partidores universales para PCR directo y anidado en el gen 16S rRNA.	15
Cuadro 2. Partidores utilizados para la identificación molecular de insectos a través de la amplificación del gen COI.	15
Cuadro 3: Detalle de las salidas a terrenos realizadas para la prospección de fitoplasmas del subgrupo ribosomal 16SrXIII-F.	19
Cuadro 4: Total de individuos colectados por región y familia taxonómica preliminar.	20
Cuadro 5: Total de individuos analizados clasificados por familia taxonómica.	20
Cuadro 6: Resultado del BLASTn realizado en Genbank para las muestra entomológicas positivas de la comuna de Pichidegua, Región de O'Higgins.....	21
Cuadro 7: Resultado del BLASTn realizado en Genbank para las muestra entomológicas positivas de la región de Magallanes y la Antártica Chilena.	21
Cuadro 8: Individuos positivos a fitoplasmas del subgrupo ribosomal 16SrXIII-F por familia.	22
Cuadro 9. Similitudes nucleotídicas obtenidas con secuencias del gen mitocondrial COI de los individuos positivos a fitoplasmas del subgrupo 16SrXIII-F.....	23
Cuadro 10: Especies de potenciales insectos vectores e información asociada a ellos.....	30
Cuadro 11: Muestra vegetales colectadas clasificadas por familias taxonómicas.	31
Cuadro 12: Muestras vegetales colectadas clasificadas por origen y familia taxonómica.....	31
Cuadro 13: Muestras vegetales que obtuvieron amplificaciones para al análisis de detección de fitoplasmas clasificadas según origen y método de extracción.	32
Cuadro 14. Resultado de las similitudes nucleotídicas obtenidas entre las muestras vegetales con amplificaciones y Genbank. Fragmento de 1250 pb.	32

Índice de Figuras

Figura 1: Colecta de insectos.....	14
Figura 2. Diferentes familias de hemípteros colectados en terreno.	20
Figura 3. Arboles filogenéticos construidos en base secuencias nucleotídicas del gen COI de individuos positivos a fitoplasmas y de referencia.....	24
Figura 4. <i>Cixiosoma</i> sp.....	25
Figura 5: <i>Delphacodes darwini</i>	26
Figura 6: Pa(3-3).	27
Figura 7: <i>Amplicephalus ornatus</i> (PD3.11(96)).	27

Figura 8: Individuos clasificados como <i>Amplicephaus</i> sp.:	28
Figura 9: <i>Trioza berberidis</i> :	29
Figura 10. <i>Notophorina</i> sp.:	29
Figura 11. Pa(4-2) y Pa(4-1):	29
Figura 12: Síntomas encontrados en terreno.	32
Figura 13. Registros fotográficos de muestras vegetales con detecciones positivas a fitoplasmas.	33

Índice de Apéndices

Apéndice A. Figuras complementarias	43
Apéndice B. Cuadros Complementarios	43

RESUMEN

Chile se sitúa entre los países del Cono Sur líderes en exportación de material vegetal de frutilla destinado a la propagación. Por lo tanto, es relevante estudiar los riesgos asociados a la diseminación de patógenos como posible efecto secundario a la comercialización de plantas. Desde el 2015 hay informes de la presencia de fitoplasmas en plantas de frutilla en Chile. Es común encontrar síntomas de filodia en huertos comerciales, debido a la presencia de un fitoplasma perteneciente al subgrupo ribosomal 16SrXIII-F. El mismo patógeno se identificó en la región de Magallanes en plantas de *Berberis microphylla* con síntomas de escobas de bruja, y recientemente en la región de O'Higgins en dos especies cítricas. Estos antecedentes indican que el fitoplasma podría estar siendo transmitido horizontalmente por medio de insectos vectores. A través de este estudio, se logró aclarar algunos aspectos epidemiológicos relacionados con el fitoplasma 16SrXIII-F. Se encontraron ocho especies de insectos potenciales vectores, pertenecientes a tres diferentes superfamilias, Fulgoroidea (dos especies), Membracoidea (tres especies) y Psylloidea (tres especies). Algunas de estas especies se pudieron identificar, mientras que otras deben ser clasificadas o representan nuevos descubrimientos. En este estudio el fitoplasma 16SrXIII-F no se detectó en especies vegetales diferentes a frutilla. Este es el primer informe acerca de potenciales insectos vectores del fitoplasma 16SrXIII-F.

Palabras clave: *Amplicephalus*, *Cixiosoma*, *Delphacodes*, *Notophorina*, *Trioza*.

ABSTRACT

Chile is among the leading countries in the Southern Cone in the export of strawberry plant material for propagation. Therefore, it is relevant to study the risks associated with the spread of pathogens as a possible side effect of plant marketing. Since 2015 there are reports of the presence of phytoplasmas in strawberry plants in Chile. It is common to find phyllody symptoms in commercial orchards, due to the presence of a phytoplasma belonging to the ribosomal subgroup 16SrXIII-F. The same pathogen was identified in the Magallanes region in *Berberis microphylla* plants with symptoms of witches' brooms, and recently in the O'Higgins region in two citrus species. These antecedents indicate that the phytoplasma could be horizontally transmitted by means of insect vectors. Through this study, it was possible to clarify some epidemiological aspects related to the 16SrXIII-F phytoplasma. Eight species of potential insect vectors were found, belonging to three different superfamilies, Fulgoroidea (two species), Membracoidea (three species) and Psylloidea (three species). Some of these species could be identified, while others must be classified or represent new discoveries. In this study the 16SrXIII-F phytoplasma was not detected in plant species other than strawberries. This is the first report about potential insect vectors of the phytoplasma 16SrXIII-F.

Keywords: *Amplicephalus*, *Cixiosoma*, *Delphacodes*, *Notophorina*, *Trioza*.

INTRODUCCIÓN

La frutilla posee elevada importancia económica mundial puesto que su cultivo es posible en una amplia variedad de climas. Sin embargo, sus rendimientos productivos se ven favorecidos en zonas templadas, condiciones típicas de las zonas costeras de Chile (Undurraga y Vargas, 2013). Dentro de su categoría, la fresa es la especie más comercializada con un total de 49,7 millones de plantas que corresponden al 67,7% de la venta total anual en Chile (ODEPA, 2014). El incremento constante de la venta de su material de propagación se debe a las variedades desarrolladas por programas genéticos internacionales de los cuales Chile es socio (INDAP, 2015). Debido a lo anterior, es relevante estudiar los patógenos que puedan afectar al cultivo. A partir del 2015, en diferentes huertos comerciales chilenos, empezaron a aparecer plantas de frutilla con síntomas de filodia y en el 2019 se identificó el fitoplasma 16SrXIII-F como agente causal de la alteración observada (Cui *et al.*, 2019).

Los fitoplasmas son bacterias carentes de pared celular pertenecientes a la clase *Mollicutes*. Son conocidos por ser parásitos obligados del floema y de los tejidos de los insectos vectores (Gasparich, 2010; Gupta *et al.*, 2018). Se asocian a más de mil enfermedades de plantas, provocando importantes daños a la producción agrícola. Las plantas infectadas por fitoplasmas exhiben una amplia gama de síntomas siendo los principales y más frecuentes el retraso del crecimiento vegetativo, amarilleces, escoba de bruja y enrojecimiento foliar (Oshima *et al.*, 2013). En órganos florales, en cambio, los fitoplasmas generan cambios morfológicos denominados virescencia y filodia (Himeno *et al.*, 2011).

La obtención de cultivos axénicos de fitoplasmas es difícil, por lo tanto, la clasificación de estos patógenos se ha elaborado tomando como base el uso de técnicas moleculares. No pudiendo satisfacer a los postulados de Koch, los fitoplasmas se incluyen el género provisional '*Candidatus Phytoplasma*' ('*Ca. P.* ') (Zhao and Davis, 2016). Su detección se ve afectada a causa factores como distribución errática en las plantas, baja concentración, fluctuación estacional y compuestos vegetales inhibidores de la polimerasa utilizada en el PCR. Pese a ello, su descubrimiento continúa a un ritmo incesante gracias a las mejoras en el uso de marcadores moleculares (Nejat y Vadamalai, 2013). La detección se basa en la amplificación por PCR de una porción del gen 16S rRNA y se completa obteniendo el perfil de restricción enzimática de su producto a través de la técnica RFLP. De esta forma, hasta la fecha han sido identificadas 49 '*Candidatus Phytoplasma*' especies y alrededor de 300 subgrupos ribosomales (Bertaccini 2022; Bertaccini y Lee, 2018; Bertaccini *et al.*, 2022; Zhao and Davis, 2016).

La epidemiología de las enfermedades causadas por fitoplasmas son consecuencia de la red que forman con plantas, insectos, factores ambientales y manejo (Alma *et al.*, 2019). Su transmisión natural puede ocurrir mediante diferentes estrategias, no obstante, la principal es por medio de insectos vectores a través de la modalidad persistente propagativa (Trivellone y Dietrich, 2021). Los vectores conocidos pertenecen principalmente a tres familias de insectos que se alimentan del floema, la familia Cicadellidae con el mayor porcentaje de especies de vectores, seguido por las superfamilias Fulgoroidea y Psylloidea (Weintraub y Beanland, 2006).

Dentro de esta red, la vegetación espontánea actúa como reservorio de fitoplasmas, representando su principal fuente de inóculo y encargándose del mantenimiento y perpetuación (Rao *et al.*, 2017). Las plantas espontáneas, no siempre presentan síntomas, probablemente debido a la larga coevolución, por lo que identificar las fuentes de inóculo se vuelve complejo (Duduk *et al.*, 2018). De esta forma tanto los huéspedes secundarios como los vectores juegan un papel clave en el ciclo epidemiológico de un fitoplasma, dado que son parte de un complejo sistema biológico (Trivellone y Dietrich, 2021).

Los fitoplasmas están presentes en al menos 85 países (Lee *et al.*, 2000), de los que Chile no está exento. El primer registro data del año 1945 y se trata de la marchitez amarilla de la remolacha, cuya diseminación se asoció a especies de insectos de la familia Cicadellidae (Hepp y Vargas, 2002). A la fecha se han detectado siete fitoplasmas en diferentes especies. En vid se han identificado los grupos ribosomales 16SrI (con dos subgrupos ribosomales), 16SrIII, 16SrV, 16SrVII y 16SrXII (Fiore *et al.*, 2007; Gajardo *et al.*, 2009). Asimismo, en los viñedos y en sus alrededores se ha reportado la presencia de malezas que actúan como reservorio de fitoplasmas (Longone *et al.*, 2011, Zamorano *et al.*, 2015). Plantas de cerezo y remolacha han sido encontradas positivas al fitoplasma perteneciente al subgrupo ribosomal 16SrIII-J (González *et al.*, 2011; Fiore *et al.*, 2015), mientras que en las especies nativas chaura (*Gaultheria phillyreifolia* P.) y murta (*Ugni molinae* T.) también han sido identificados fitoplasmas del grupo 16SrVII (Arismendi *et al.*, 2010).

En los últimos años en Chile se ha identificado fitoplasmas pertenecientes al grupo ribosomal 16SrXIII. Una de las especies afectadas es el arbusto nativo *Berberis microphylla* G. conocido comúnmente como calafate. Madariaga y Ramírez (2019) detectaron el fitoplasma 16SrXIII-F en muestras colectadas desde plantas con escobas de brujas presentes en la región de Magallanes y la Antártica Chilena. Por otro lado, alejado de la zona austral chilena, el cultivo de frutilla se suma a las especies infectadas por este mismo fitoplasma. Desde el año 2015, en diferentes regiones de las zonas centro-sur se reportaron síntomas propios de enfermedades causadas por fitoplasmas, sin embargo, a diferencia del calafate, la sintomatología cambia drásticamente, siendo la filodia e hipertrofia de aquenios los síntomas característicos para la enfermedad denominada Filodia de la Fresa (StrPh), detectándose esta vez los subgrupos ribosomales 16SrXIII-F y K (Cui *et al.*, 2019). Asimismo, Quiroga *et al.*, (2021) presentan el primer reporte del fitoplasma 16SrXIII-F en plantas de cítricos en Chile, en donde árboles de *Citrus reticulata* (mandarina) y *Citrus sinensis* (naranja) presentaban amarillamiento generalizado, floración asincrónica, hojas filiformes y escobas de bruja.

En resumen, existen registros de infecciones del fitoplasma 16SrXIII-F desde el año 2015 para cuatro especies vegetales. Pese a ello, aún se desconoce si hay insectos vectores del fitoplasma y especies vegetales espontáneas que pudiesen estar actuando como reservorio del patógeno. A tal propósito, se vuelve necesario realizar estudios epidemiológicos, que nos ayuden a dilucidar el ciclo de la enfermedad asociada al fitoplasma 16SrXIII-F.

Considerando los vacíos de conocimiento acerca del comportamiento epidemiológico en Chile y en el mundo de los fitoplasmas asociados a la filodia de la frutilla, pertenecientes al grupo 16SrXIII, que en Chile infectan a especies de interés económico como la frutilla, cítricos y especies nativas como el calafate, es relevante averiguar presencia de insectos vectores y plantas reservorio de este fitoplasma.

HIPÓTESIS

Existen especies de insectos y de plantas espontáneas, infectadas con el fitoplasma del subgrupo ribosomal 16SrXIII-F asociado a la filodia de la frutilla (StrPh) en Chile.

OBJETIVOS

Objetivo general

Identificar potenciales insectos vectores y especies de plantas espontáneas hospederas del fitoplasma 16SrXIII-F.

Objetivos específicos

1. Identificar especies de insectos potenciales vectores del fitoplasma 16SrXIII-F capturados en huertos de frutilla, cítricos y en las zonas de presencia de calafate.
2. Identificar especies de plantas espontáneas que podrían actuar como reservorio del fitoplasma 16SrXIII-F, que crecen en o en la cercanía de la zona de presencia del calafate, huertos de frutillas y cítricos infectados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación de estudio

El estudio se realizó en el Laboratorio de Fitovirología ubicado en la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile (Coordenadas 33°34'11"S 70°37'50"O). La colecta de muestras de insectos y especies vegetales se realizó en las regiones del Libertador General Bernardo O'Higgins, Bío-Bío, Magallanes y la Antártica Chilena.

Material biológico

Como material biológico se utilizaron muestras vegetales de *Fragaria x ananassa*, *Citrus reticulata* y *Berberis microphylla*, además de plantas espontáneas asociadas a la especies mencionadas e insectos obtenidos desde las diferentes zonas de muestreo.

Manejo del experimento

Salidas a terreno

Para ambos objetivos específicos se realizaron un total de ocho salidas a terreno, entre mayo del 2021 y enero del 2022, a huertos y zonas de crecimiento de las especies vegetales indicadas anteriormente, las cuales presentaban síntomas asociados a presencia de fitoplasmas. A estos muestreos se sumaron las 6 colectas de muestras que realizó el Sr. Mauricio Estrada Llanos, quien colaboró con la investigación desde la región de Magallanes y la Antártica Chilena para la prospección asociada a *Berberis microphylla*. El detalle de los lugares estudiados se muestra en el Cuadro 3 y las fechas de los envíos en el Apéndice B1.

Actividades asociadas al objetivo específico 1: Identificar especies de insectos potenciales vectores del fitoplasma 16SrXIII-F capturados en huertos de frutilla, cítricos y en las zonas de presencia de calafate.

Se capturaron insectos y se analizaron con la técnica nested-PCR utilizando partidores universales para la detección de fitoplasmas, para ello se consideraron las siguientes actividades.

Actividad 1.1 Captura de insectos. Los insectos fueron capturados en las regiones de O'Higgins, Bío-Bío y Magallanes, realizando barridos con una red entomológica dirigidos al cultivo y a la vegetación espontánea presente en el lugar. Los insectos capturados se guardaron en tubos de ensayo con tapa de algodón. La actividad se realizó durante las primeras horas de la mañana en estaciones de primavera y verano, mientras que en las estaciones de otoño e invierno las capturas se realizaron cerca del mediodía, que es generalmente cuando ocurre el mayor vuelo de los insectos. Los insectos capturados se colocaron en una nevera y se trasladaron al laboratorio.



Figura 1: Colecta de insectos. A: En un arbusto de calafate en la zona urbana de Punta Arenas, región de Magallanes y la Antártica Chilena; B: En un huerto de frutilla tradicional de un productor de la Cooperativa Fruticoop en la comuna de Litueche, región de O'Higgins.

Actividad 1.2. Identificación morfológica de insectos. Los insectos se observaron y fotografiaron utilizando una lupa binocular LEICA S6D. Se separaron en grupos en base a sus caracteres morfológicos tales como tamaño, forma, color y patrones en el dorso. Los individuos fueron analizados para la detección de fitoplasmas y las fotos de los individuos resultados positivos, fueron enviadas al Dr. Juan Francisco Campodónico de la Universidad Austral de Chile, para la identificación. En paralelo se realizó la identificación en el Laboratorio de Fitovirología de la Universidad de Chile, de acuerdo con la información morfológica desarrollada en estudios anteriores (Longone *et al.*, 2011; Fiore *et al.*, 2015; Quiroga *et al.*, 2019). Los insectos se guardaron a 4°C en etanol al 70%.

Actividad 1.3. Extracción de DNA de insectos. Se escurrió el etanol en el cual se conservaron los insectos y todo residuo de este alcohol se eliminó colocando los tubos Eppendorf en el SPEEDVAC por 20 min. De cada individuo se extrajo el DNA para los análisis a realizar. A cada tubo se añadió 100 μ L de tampón de extracción y se trituró el insecto con el uso de un pistilo adaptado para microtúbulos. Se agregaron otros 400 μ L del mismo tampón, se agitó con vortex y se incubó por 1 hora en un baño termorregulado a 60°C, agitando cada 10 min. Posteriormente, se agregaron 500 μ L de cloroformo y se centrifugó por 20 min a 4°C y 15.000 \times g para la separación de las fases. Desde el sobrenadante se transfirieron 400 μ L a nuevos tubos Eppendorf, a los que posteriormente se añadieron 300 μ L de isopropanol. Se mantuvieron los tubos a temperatura ambiente por 10 min, para favorecer la precipitación del DNA. Luego de la precipitación se centrifugó por 15 min a 4°C y 15.000 \times g y al final se descartó el sobrenadante. El DNA se lavó con etanol al 70% y se volvió a centrifugar por 10 minutos en las condiciones descritas anteriormente. Finalmente, se descartó el etanol y se secó el DNA por 20 minutos en SPEEDVAC. El DNA se resuspendió en 100 μ L de tampón TE. Para el PCR se utilizó una dilución 1:10.

Actividad 1.4. Detección de fitoplasmas en insectos. La detección de fitoplasmas se realizó a través de nested-PCR con partidores universales que amplifican regiones del gen 16S rRNA (Schaff *et al.*, 1992; Gundersen y Lee, 1996). Para el PCR directo se utilizó la pareja de partidores P1/P7 que amplifican 1819 pb. El producto de

amplificación del PCR directo se diluyó 1:10 para realizar el PCR anidado con el par de partidores R16F2n/R2 que amplifican aproximadamente 1250 pb (Cuadro 1).

Cuadro 1. Partidores universales para PCR directo y anidado en el gen 16S rRNA.

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

Cada reacción de PCR se realizó utilizando un volumen final de 30 µL con los siguientes componentes: 1-1,5 µL de DNA templado, 1 µL de cada partidor universal (25 µM), 3 µL de buffer PCR (10×), 1,5 µL de MgCl₂ (50 µM), 1 µL de dNTPs (10 µM), 20,8 µL de agua ultra estéril y 0,2 µL de enzima Taq polimerasa Platinum (Invitrogen). Todos se disponen en un tubo de pared delgada de 200 µL. Las reacciones se realizaron en un termociclador (Verity 96 wells, Applied Biosystems) con los siguientes ciclos de temperatura: Incubación inicial de 1 minuto a 94°C; 35 ciclos cada uno compuesto por la desnaturalización de 30 segundos a 94°C, apareamiento de los partidores por 45 segundos a 53°C y elongación de 90 segundos a 72°C; extensión final a 72°C por 7 minutos.

Actividad 1.5. Análisis molecular para la identificación de insectos. La identificación morfológica se complementó mediante un análisis molecular a través de la amplificación del gen mitocondrial citocromo-C-oxidasa subunidad 1 (COI), conocido como “DNA Barcode”. Se utilizaron los mismos extractos de DNA obtenidos en la Actividad 1.3. El producto de amplificación esperado es de 770 bp (Cuadro 2).

Cuadro 2. Partidores utilizados para la identificación molecular de insectos a través de la amplificación del gen COI.

Partidores	Secuencia partidores (5' - 3')	Cita bibliográfica
LCO1490	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	Vrijenhoek, 1994
HCO2198	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA	Vrijenhoek, 1994

Actividad 1.6. Electroforesis. Los productos de amplificación obtenidos desde el PCR anidado para detección de fitoplasmas y el análisis COI, se separaron a través de electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio y utilizando el buffer TAE 1X (Tris 40 mM, 20 mM de ácido acético y EDTA 1 mM, pH 8,0). Para la determinación del tamaño de los fragmentos amplificados se utilizó un marcador de referencia 100 bp DNA ladder (Maestrogen). La electroforesis se realizó utilizando una fuente de poder (EPS – 300 IIV) a 110 voltios durante 25 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.

Actividad 1.7. Secuenciación de los productos de amplificación. Los productos de amplificación de PCR para el análisis de detección de fitoplasmas y los del gen COI se enviaron a secuenciar. Solo en el caso de los fitoplasmas fue necesario clonar los

fragmentos antes de secuenciar. Por otro lado, la secuencia del gen COI solo se requirió para los individuos positivos a fitoplasmas o para aquellos que pertenecían a especies nuevas aún no clasificadas. Con las secuencias obtenidas se realizó un BLASTn utilizando la base de datos Genbank.

Subactividad 1.7.1. Clonamiento de los amplicones positivos provenientes del nested-PCR para la detección de fitoplasmas: Posterior a la electroforesis se recortaron las bandas de DNA de interés en tubos Eppendorf de 1,5 mL. Para purificar el DNA desde el gel se utilizó el kit 'EZNA Gel Extraction' de Omega®. Para la reacción de ligamiento se utilizó el Kit pGEM-Teasy Vector® (Promega, Madison, Wisconsin, USA). Se usaron células competentes de *Escherichia coli* cepa Top 10 C para clonar el producto de amplificación. Luego se realizó un PCR de colonia usando los partidores de la zona flanqueadora del plásmido, SP6 y T7.

Subactividad 1.7.2. Secuenciación de colonias resultantes de la Subactividad 1.7.1 y de los productos de amplificación COI: Los productos de PCR provenientes de tres colonias de las muestras positivas se purificaron y se secuenciaron en ambas direcciones. En el caso del gen COI, el amplicón se envió directamente a secuenciar desde sus productos de PCR. Para esto se enviaron las muestras a Psmagen Inc., Rockville, MD, Estados Unidos.

Actividad 1.8. Análisis de secuencias. Las secuencias del gen 16S rRNA del fitoplasma obtenidas de las muestras entomológicas y las obtenidas de la amplificación del gen de COI fueron comparadas frente a las bases de datos de Genbank mediante BLASTn y se realizó un análisis bioinformático que incluyó alineamientos en Bioedit v7.2 y construcción de árboles filogenéticos mediante Neighbor-Joining y Máxima Verosimilitud, usando el programa MEGA v7.0. En el caso de la identificación molecular de los insectos, para los análisis filogenéticos se utilizaron también las secuencias de algunas especies encontradas en Chile (Quiroga *et al.*, 2020).

Actividad 1.9. Identificación de los fitoplasmas. A partir de las secuencias obtenidas desde los amplicones del gen 16S rRNA, se realizó un análisis de polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción *in silico* (RFLP) para modelar el comportamiento electroforético de los fragmentos obtenidos por digestión enzimática del amplicón del gen 16Sr RNA, utilizando una batería de 23 enzimas de restricción, disponibles en la herramienta web *iPhyClassifier* :

(<https://plantpathology.ba.ars.usda.gov/cgi-bin/resource/iphyclassifier.cgi>) (Zhao *et al.*, 2009).

Actividades asociadas al objetivo específico 2: Identificar especies de plantas espontáneas que podrían actuar como reservorio del fitoplasma 16SrXIII-F, que crecen en o en la cercanía de la zona de presencia del calafate, huertos de frutillas y cítricos.

Se recolectaron muestras de especies vegetales en estudio y posibles especies hospederas en las diferentes salidas a terreno. Se analizaron con la técnica nested-PCR utilizando partidores universales para la detección de fitoplasmas, para ello se consideraron las siguientes actividades:

Actividad 2.1 Muestreo. El muestreo se dirigió principalmente a plantas que presentaban síntomas típicos de fitoplasmas tales como amarilleces, escoba de bruja, coloración rojiza de hojas o tallos, ausencia o asincronía en la floración, entre otros. También se muestrearon plantas asintomáticas ya que muchas especies pueden resultar infectadas por fitoplasmas, sin que haya manifestación de síntomas.

Actividad 2.2. Colecta de muestras. Se tomaron fotos en terreno de las plantas muestreadas y se anotaron los eventuales síntomas presentes. Cada muestra se introdujo en una bolsa de plástico y se colocó en un cooler con hielo hasta la llegada al laboratorio. En el laboratorio, se tomaron más fotos para tener registro de los detalles de los síntomas y a cada muestra se les asignó un código interno correlativo. De cada muestra se separaron las nervaduras centrales, las raíces, las secciones de tallo o los ápices de los brotes. Este material vegetal se conservó a -80°C hasta el momento de la extracción del DNA.

Actividad 2.3. Identificación morfológica de plantas. Se realizó una identificación de las especies vegetales encontradas a partir de las características morfológicas, considerando forma de hojas, estructuras florales, tipo de crecimiento, entre otros.

Actividad 2.4 Extracción de DNA. Se utilizaron tres métodos de extracción, CTAB, TNA y uso del kit GeneAll® Exgene™ Plant SV. Debido a la diversidad de las especies vegetales analizadas, fue necesario utilizar los tres protocolos de extracción para garantizar la mayor limpieza posible del DNA, compatiblemente con obtener la mayor concentración del DNA de fitoplasmas en el extracto. Todo esto con el fin de evitar resultados falsos negativos por inhibición de la Taq-polimerasa y por baja concentración de DNA del patógeno.

Para el método TNA, de cada muestra se separó aproximadamente 150 mg de tejido floemático, el cual se molió en tampón de extracción (tiocianato de guanidina 4,0 M, acetato de sodio 0,2 M, EDTA 25 mM, acetato de potasio 1 M, PVP 40 kdal 2,5 % p/v y β -mercaptoetanol 3 mM) y se procesó según el método de captura de sílica (Malinovski, 1997; Rott y Jelkmann, 2001).

Para el kit de extracción GeneAll® Exgene™ Plant SV se utilizó el protocolo “Protocol for Plant SV mini” especificado en el HandBook dentro mismo y siguiendo las especificaciones del fabricante. El protocolo se encuentra disponible en línea en https://www.geneall.com/sub/products/prod.asp?mode=view&idx=102&s_keyword=&s_cate=1116&s_filter=&s_browser=&s_display=&s_align=0.

El método CTAB se utilizó para la extracción de DNA en 94 muestras vegetales, con el kit de extracción GeneAll® Exgene™ Plant SV se extrajo DNA de 32 muestras y con el método TNA se extrajo material genético de un total de 8 muestras. La comparación de los métodos no se encuentra dentro de los objetivos del estudio, la elección dependió principalmente del tipo de material vegetal, con la finalidad de obtener el extracto más limpio posible y con mayor cantidad de DNA. Las muestras extraídas con al menos dos métodos se detallan en el Apéndice B3.

Para la extracción de DNA con el método CTAB se siguió el protocolo modificado de Porebski *et al.* (1997) que consiste en lo siguiente: Se trituró 1 gramo de muestra utilizando nitrógeno líquido con tierra de diatomeas (Sigma, D-5509) hasta obtener un

polvo fino. El tejido molido se incubó a 65°C durante 1 hora en 10 mL de tampón de extracción con bromuro de hexadeciltrimetilamonio al 3% (CTAB), polivinilpirrolidona al 3% 40.000 (PVP40), NaCl 1,4 M, EDTA 0,02 M, pH = 8,0, 0,1 Tris-HCl M, pH = 8,0, y β-mercaptoetanol 0,003 M. Terminada la incubación, la mezcla se sometió a una centrifugación a temperatura ambiente durante 10 minutos a 10.000 ×g. El sobrenadante resultante de la centrifugación se separó y se mezcló con un volumen igual de cloroformo:isopropanol (24:1) y se centrifugó a temperatura ambiente durante 20 minutos a 9.000 ×g. A la capa acuosa recuperada, se añadió la mitad del volumen de la mezcla de NaCl 5M y dos volúmenes de etanol frío. La mezcla se mantuvo a -20°C por 16 horas para favorecer la precipitación del DNA. Luego se centrifugó y se lavó el sedimento con etanol al 70%. El sedimento se resuspendió con 500 µL de tampón TE y se trató con 100 µg/mL de RNasaA a 37°C durante 1 hora. Posteriormente se agregaron 10 µg/mL de proteinasa K y se incubaron a 60°C por 30 min. Se añadió el mismo volumen de fenol:cloroformo:isopropanol (25:24:1) a la solución resultante la cual se agitó brevemente con un vórtex. La mezcla se centrifugó nuevamente por 15 minutos a 10.000 g. De la mezcla anterior se rescató el sobrenadante. El DNA se precipitó añadiendo 1/10 de volumen de acetato de sodio 3M, pH 5,2 y dos volúmenes de etanol, se centrifugó y lavó con etanol al 70%. El sedimento se resuspendió en 100 µL de tampón TE.

Actividad 2.5. Detección de fitoplasmas mediante nested-PCR: La detección de fitoplasmas se realizó de igual manera que en las actividades detalladas para la realización de Objetivo específico 1. Para el PCR se utilizaron diluciones de DNA 1:10 y 1:100 y se siguió el mismo protocolo descrito en Schaff *et al.* (1992).

Actividad 2.6. Electroforesis: Los productos de amplificación se visualizaron como ya descrito en la Actividad 1.6.

Actividad 2.7 Obtención y análisis de secuencias: Los productos amplificados en el nested-PCR que arrojaron bandas de interés en la electroforesis se clonaron, secuenciaron y analizaron de la misma manera que en las actividades 1.8 y 1.9.

Actividad 2.8. Identificación de los fitoplasmas: Se realizó un análisis RFLP *in silico*, como el detallado en actividad 1.9.

RESULTADOS

Salidas a terreno

Se realizaron un total de ocho salidas a tres diferentes regiones relacionadas con: 1) Cultivo de frutilla y su ancestro nativo *Fragaria chiloensis*, 2) Cítricos, en donde el muestreo se centró únicamente en *Citrus reticulata* y 3) Calafate, para el cual además de realizarse una salida a terreno a la región de Magallanes, se contó con el apoyo del Sr. Mauricio Estrada Llanos quien en seis ocasiones realizó muestreos y envíos tanto de material vegetal como entomológico (Apéndice B1). El detalle de las salidas se presenta en el Cuadro 3.

Cuadro 3: Detalle de las salidas a terrenos realizadas para la prospección de fitoplasmas del subgrupo ribosomal 16SrXIII-F.

Salida	Región	Comuna	Fecha	Localidad	Coordenadas	Especie asociada
1	O'Higgins	Litueche	18/05	San Vicente	-34.047386, - 71.725719	Frutilla
2			22/06	San Vicente	-34.044448, - 71.729066	
3			19/07	Fruticoop Cardenal Caro	-34.128671,- 71.711177	
4		Pichidegua	11/08,	La Junta	-34.295136,- 71.421935	Mandarina
5			6/10 y			
6			3/11			
7	Bío-Bío	Contulmo	25/11	Sector Monumento Natural Contulmo	-38.052358, - 73.190057	<i>Fragaria chiloensis</i>
		Los Ángeles	26/11	El Peral	-37.508781,- 72.211855	Frutilla
8	Magallanes	Punta Arenas	3 al 7 /01/22	Detalle de los lugares (Ap. B2)		Calafate

Potenciales insectos vectores

Colecta e identificación general de muestras entomológicas

En las salidas a terreno se colectaron y clasificaron en base a morfología general seis familias taxonómicas de insectos a la cual pertenecen especies eficientes, según literatura, en la transmisión de fitoplasmas. Se colectaron tres individuos de la familia Achilidae de forma equivocada por su parecido morfológico con la familia Cixiidae (Figura 2). Con las ocho salidas a terreno, más los seis envíos de muestras, se reunieron 2811 insectos en diferentes estadios de vida, más de la mitad de ellos miembros de la familia Triozidae. La confirmación de las familias de los individuos se realizó solo para aquellos infectados por fitoplasmas y se pueden encontrar las definitivas en el Cuadro 9, para este ítem se clasificaron seis familias preliminarmente (Cuadro 4).

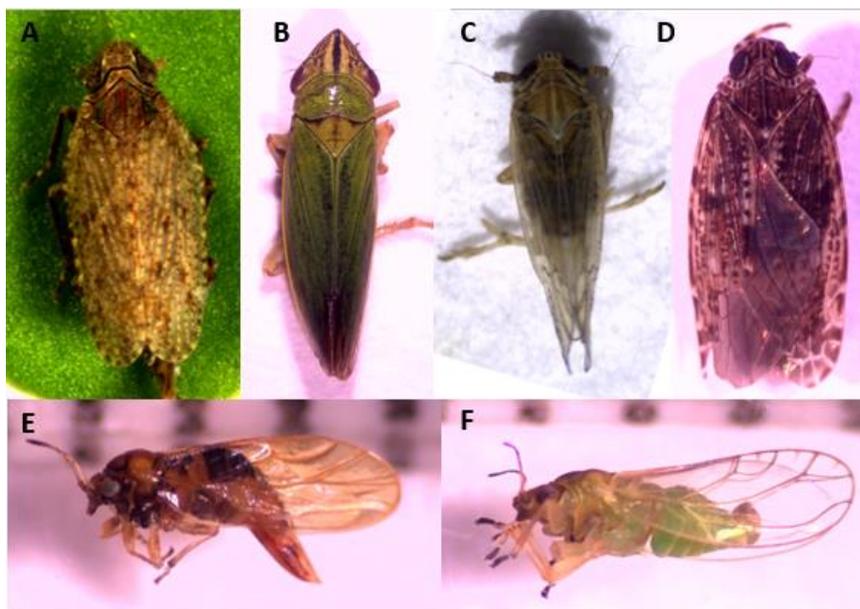


Figura 2. Diferentes familias de hemípteros colectados en terreno. A: Individuo de la familia Cixiidae; B: Ejemplar de la especie *Syncharina lineiceps*, familia Cicadellidae; C: Ejemplar de la familia Delphacidae; D: Ejemplar de la familia Achilidae; E: Ejemplar del género *Nothoporina*, familia Liviidae; F: Macho del género *Triozza*, familia Triozidae.

Cuadro 4: Total de individuos colectados por región y familia taxonómica preliminar.

Región	N° de individuos capturados por familia tentativa						Total
	Cixiidae	Cicadellidae	Delphacidae	Psyllidae	Tiozidae	Achilidae	
O'Higgins	338	229	10	58	0	0	635
Bío-Bío	4	254	5	5	0	3	271
Magallanes	0	273	0	53	1579	0	1905
Total	342	756	15	116	1579	3	2811

Detección de '*Candidatus Phytoplasma especies*' mediante nested-PCR para el gen 16S rRNA

Para averiguar la presencia de fitoplasmas, 1440 individuos se analizaron frente a los 2811 capturados (Cuadro 5). Se decidió no analizar todos los individuos puesto que existía una gran cantidad de ellos ya analizados que eran morfológicamente idénticos y con un mismo origen. De las seis familias de insectos propuestas de forma preliminar, se obtuvo amplificación en al menos un individuo en todas excepto en la familia Achilidae. En total, fueron 31 individuos con amplificaciones positivas, cuatro individuos en la Región de O'Higgins (Cuadro 6) y 27 en la Región de Magallanes (Cuadro 7).

Cuadro 5: Total de individuos analizados clasificados por familia taxonómica.

Región	N° de individuos capturados por familia tentativa						Total
	Cixiidae	Cicadellidae	Delphacidae	Psyllidae	Tiozidae	Achilidae	
O'Higgins	135	193	10	58	0	0	396
Bío-Bío	4	99	5	5	0	3	116
Magallanes	0	145	0	49	734	0	928
Total	139	437	15	112	734	3	1440

Análisis de secuencias de amplificaciones positivas del gen de la subunidad ribosomal 16Sr para identificación de fitoplasmas

De los 1440 individuos analizados en duplicado se obtuvieron 31 amplificaciones positivas a fitoplasmas, lo que equivale a un 2,15% del total de insectos analizados. Los resultados de estos se muestran por región a continuación:

Región del Libertador General Bernardo O'Higgins: Los cuatro individuos que dieron origen a un producto de amplificación en el análisis nested-PCR se capturaron en un huerto de *Citrus reticulata* en la comuna de Pichidegua y pertenecen a tres familias taxonómicas. Los resultados de la secuenciación confirmaron que los productos de amplificación corresponden a fitoplasmas, con un rango de 99,64 a 100% de identidad nucleotídica con las cepas chilenas del fitoplasma 16SrXIII-F (Cuadro 6).

Cuadro 6: Resultado del BLASTn realizado en Genbank para las muestras entomológicas positivas de la comuna de Pichidegua, Región de O'Higgins.

Código insecto	Familia	Resultado BLASTn	Subgrupo ribosomal	% Cobertura	% Identidad
PD11.8 (F3)	Cixiidae	<i>Fragaria X ananassa</i> phyllody	16SrXIII-F (CL5)	99	99,89
PD6.10 (1-2)	Cixiidae	<i>Fragaria X ananassa</i> phyllody	16SrXIII-F (CL5)	99	99,89
PD3.11(96)	Cicadellidae	<i>Fragaria X ananassa</i> phyllody	16SrXIII-F (CL7)	92	100
PD3.11(108)	Delphacidae	<i>Fragaria X ananassa</i> phyllody	16SrXIII-F (CL5)	100	99,64

Región de Magallanes y la Antártica Chilena. Los 27 individuos que originaron un producto de amplificación pertenecen a las familias Cicadellidae, Psyllidae*(confirmada posteriormente en los análisis moleculares como Liviidae) y, en mayor proporción, Triozidae. En 24 individuos se obtuvo una secuencia de calidad del producto de amplificación coincidente con fitoplasmas del subgrupo ribosomal 16SrXIII-F. Asimismo, las secuencias de tres individuos indicaron la presencia de fitoplasmas del subgrupo 16SrIII-J (Cuadro 7).

Cuadro 7: Resultado del BLASTn realizado en Genbank para los individuos positivos de la región de Magallanes y la Antártica Chilena.

Código insecto	Familia tentativa	Resultado BLASTn 16Sr	Subgrupo Ribosomal	% Cobertura	% Identidad
Pa(1A)	Cicadellidae	<i>Fragaria X ananassa</i> phyllody	16SrXIII-F(CL1)	100	99,84
Pa(1C)	Cicadellidae	<i>Fragaria X ananassa</i> phyllody	16SrXIII-F(CL1)	100	99,92
Pa(4B)	Triozidae	<i>Fragaria X ananassa</i> phyllody	16SrXIII-F (CL5)	100	99,89
Pa(4C)	Triozidae	<i>Fragaria X ananassa</i> phyllody	16SrXIII-F (CL5)	99	99,79
Pa(4D)	Triozidae	<i>Fragaria X ananassa</i> phyllody	16SrXIII-F (CL5)	62	81,97
Pa(4D1)	Triozidae	<i>Fragaria X ananassa</i> phyllody	16SrXIII-F (CL5)	100	99,79
Pa(4E)	Triozidae	<i>Beta vulgaris</i> ' phytoplasma	16SrIII-J	100	99,89
Pa(4F)	Triozidae	<i>Amplicephalus curtulus</i> ' X-disease phytoplasma	16SrIII-J	100	99,79
Pa(4L)	Triozidae	<i>Fragaria X ananassa</i> phyllody	16SrXIII-F(CL7)	99	100
Pa(4N)	Triozidae	<i>Fragaria X ananassa</i> phyllody	16SrXIII-F(CL7)	100	99,89

Pa(4S)	Triozidae	<i>Fragaria X ananassa</i> phyllody	16SrXIII-F(CL7)	99	99,89
Pa(3-3)	Cicadellidae	<i>Fragaria X ananassa</i> phyllody	16SrXIII-F(CL7)	100	99,84
Pa(4-1)	Psyllidae*	<i>Fragaria X ananassa</i> phyllody	16SrXIII-F (CL5)	100	100
Pa(4-2)	Psyllidae*	<i>Fragaria X ananassa</i> phyllody	16SrXIII-F(CL1)	99	99,66
Pa(4-4)	Cicadellidae	<i>Fragaria X ananassa</i> phyllody	16SrXIII-F (CL5)	100	99,84
Pa(6-2)	Cicadellidae	<i>Lactuca sativa</i> ' X-disease phytoplasma	16SrIII-J	99	99,79
Pa(8-2)	Triozidae	<i>Fragaria X ananassa</i> phyllody	16SrXIII-F (CL5)	99	99,68
Pa(9-16)	Triozidae	<i>Fragaria X ananassa</i> phyllody	16SrXIII-F(CL1)	100	100
Pa(9-22)	Triozidae	<i>Fragaria X ananassa</i> phyllody	16SrXIII-F (CL5)	100	99,84
Pa(9-4)	Triozidae	<i>Fragaria X ananassa</i> phyllody	16SrXIII-F (CL5)	100	99,84
Pa(9-8)	Triozidae	<i>Fragaria X ananassa</i> phyllody	16SrXIII-F (CL5)	100	99,6
Pa (PC4-2)	Triozidae	<i>Fragaria X ananassa</i> phyllody	16SrXIII-F (CL5)	97	99,68
Pa(PC5-3)	Triozidae	<i>Fragaria X ananassa</i> phyllody	16SrXIII-F (CL5)	100	100
PA(PMB7-25)	Psyllidae*	<i>Fragaria X ananassa</i> phyllody	16SrXIII-F (CL5)	100	99,18
Pa(RP1-15)	Triozidae	<i>Fragaria X ananassa</i> phyllody	16SrXIII-F(CL7)	100	99,89
Pa(RP1-16)	Triozidae	<i>Fragaria X ananassa</i> phyllody	16SrXIII-F (CL5)	100	99,78
Pa(RP3-17)	Triozidae	<i>Fragaria X ananassa</i> phyllody	16SrXIII-F (CL5)	99	99,57

*Explicación en el texto.

Resumen del análisis de secuencias: Todas las secuencias se analizaron también a través de RFLP *in silico* (datos no mostrados), confirmando la identificación de los fitoplasmas presentes en los 31 individuos positivos. Los fitoplasmas pertenecientes al subgrupo ribosomal 16SrXIII-F se detectaron en 28 individuos, mientras que los del subgrupo 16SrIII-J se detectaron en 3 individuos. Los 28 individuos positivos al fitoplasma 16SrXIII-F son potenciales insectos vectores del mismo y pertenecen a cinco familias taxonómicas (Cuadro 8). Tres de ellos clasificados como Psyllidae* de forma preliminar basado solo en la morfología, pero posteriormente confirmados dentro de la familia Liviidae.

Cuadro 8: Individuos positivos a fitoplasmas del subgrupo ribosomal 16SrXIII-F por familia.

	Familia					Total
	Cixiidae	Cicadellidae	Delphacidae	Psyllidae*	Triozidae	
N° potenciales insectos vectores	2	6	1	3	16	28

Análisis de las secuencias del gen mitocondrial citocromo oxidasa I (COI)

Con el fin de evitar repeticiones innecesarias en caso de proceder de una misma muestra vegetal y de mostrar idéntica morfología, solo 17 de los 28 individuos infectados por fitoplasmas del subgrupo 16SrXIII-F se enviaron a secuenciación (Cuadro 9). Por otro lado, dos de los tres individuos infectados por el fitoplasma 16SrIII-J se enviaron al mismo proceso (Apéndice B6).

Identidad de las secuencias correspondiente al gen COI. Los individuos que amplificaron exitosamente la región del gen COI presentaron identidades de secuencias nucleotídicas entre 81,87% y 87,37%, con alto porcentaje de cobertura (Cuadro 9). Considerando que, para el orden Insecta, el individuo estudiado corresponde a la misma especie que la de referencia cuando la identidad de secuencia del gen COI es igual o mayor al 97% (Zhang and Bu, 2022), resulta claro que los individuos colectados en este trabajo pertenecen a especies no presentes en el banco de genes utilizado. Todos los individuos tienen coincidencias con especies

pertenecientes a la familia asignada de forma preliminar, exceptuando el individuo PA(PMB7-25) para el cual la familia fue Psyllidae, pero obtuvo mayores porcentajes de identidad con *Psyllopsis discrepans*, familia Liviidae y Pa(4-2) para el cual la familia preliminar también fue Psyllidae, pero obtuvo mayores porcentajes de identidad con *Trioza urticae*, familia Triozidae*, este último individuo se clasificó posteriormente en el análisis filogenético dentro de la familia Liviidae (Cuadro 9).

Cuadro 9. Similitudes nucleotídicas obtenidas con secuencias del gen mitocondrial COI de los individuos positivos a fitoplasmas del subgrupo 16SrXIII-F.

Código insecto	Familia	Resultado BLASTn COI (especie más cercana)	% Cobertura	% Identidad
PD11.8 (F3)	Cixiidae	<i>Cixus praecox</i>	95	87,37
PD3.11(108)	Delphacidae	<i>Delphacodes puella</i>	97	85
PD3.11(96)	Cicadellidae	<i>Deltocephalus serpentinus</i>	95	83,2
Pa(1A)	Cicadellidae	<i>Polyamia apicata</i>	92	84,64
Pa(1C)	Cicadellidae	<i>Polyamia apicata</i>	92	84,62
Pa(4B)	Triozidae	<i>Trioza remota</i>	98	84,3
Pa(4C)	Triozidae	<i>Trioza remota</i>	98	84,3
Pa(4L)	Triozidae	<i>Trioza sp.</i>	97	84,38
Pa(3-3)	Cicadellidae	<i>Polyamia apicata</i>	92	85,69
Pa(4-2)	Triozidae*	<i>Trioza urticae</i>	99	81,87
Pa(4-4)	Cicadellidae	<i>Polyamia apicata</i>	92	84,62
Pa(8-2)	Triozidae	<i>Trioza remota</i>	99	84,16
Pa(PC4-2)	Triozidae	<i>Trioza remota</i>	99	84,16
Pa(PC5-3)	Triozidae	<i>Craspedolepta alaskensis</i>	91	81,89
PA(PMB7-25)	Liviidae	<i>Psyllopsis discrepans</i>	99	82,90
Pa(RP1-15)	Triozidae	<i>Trioza remota</i>	99	84,04
Pa(RP3-17)	Triozidae	<i>Trioza remota</i>	99	84,16

*Explicación en el texto.

Análisis filogenéticos de las secuencias del gen mitocondrial citocromo oxidasa 1 (COI)

Los análisis contienen 29 secuencias nucleotídicas que incluyen a los individuos potenciales vectores de fitoplasma encontrados en este estudio (16SrXIII-F y 16SrIII-J) y a las especies de referencia con el más altos porcentajes de identidad encontradas en Genbank (Figura 3).

Análisis filogenético construido con el método de Máxima Verosimilitud. Se distinguieron 3 grandes clados o grupos que se representaron como superfamilias.

Superfamilia Psylloidea: Se divide en dos subgrupos con tres familias. La primera es la familia Triozidae, en donde se incluyen ocho individuos, estos se encuentran relacionados cercanamente con el género *Trioza*. Dentro del mismo clado anterior se incluye la especie *Craspedolepta alaskensis* perteneciente a la familia Aphalaridae en una rama única. Dos individuos se agruparon con las especies las especies *P. discrepans* y *Diaphorina citri*, ambas clasificadas en la familia Liviidae.

Superfamilia Membracoidea: Este clado representa en específico a la familia a Cicadellidae. Las muestras se separaron en cuatro ‘subgrupos’, tres de ellos representados por un único individuo por rama. El análisis de las distancias para estimar la cantidad de especies potenciales vectores se encuentra en el Apéndice B4.

Superfamilia Fulgoroidea: Finalmente, el último gran grupo se alejó de los anteriores y se dividió en dos subgrupos. En cada uno ellos una muestra se situó con las especies de mayor identidad mencionadas en el Cuadro 9. Ambas familias comparten un ancestro común (Figura 3A).

Análisis filogenético molecular construido con el método Neighbor-Joining. El análisis de las secuencias mediante este método arrojó resultados idénticos al realizado con Máxima Verosimilitud, mismos grandes grupos o clados y asociaciones entre secuencias de especies de referencia. Existieron pequeñas variaciones en la valoración del *Bootstrap* (Figura 3B).

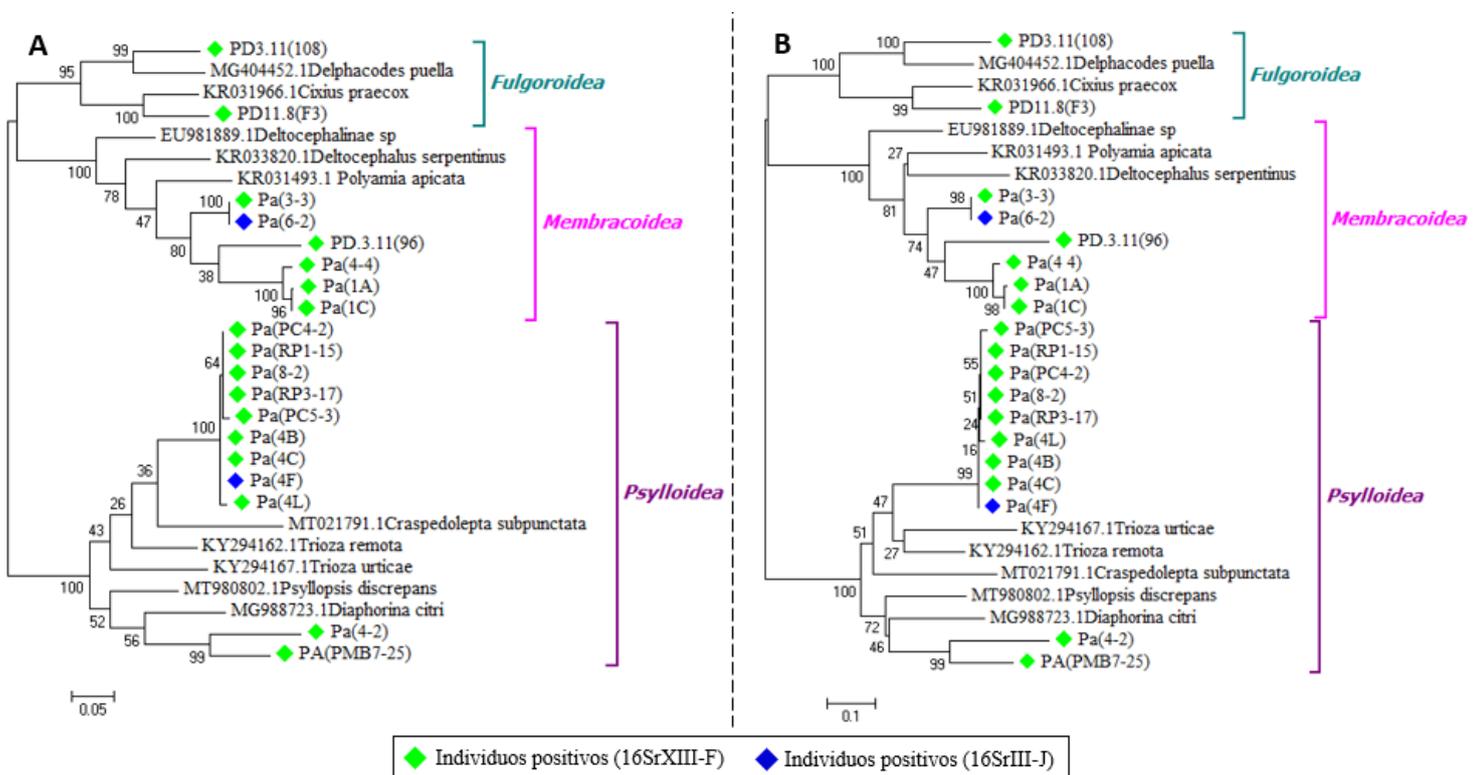


Figura 3. Árboles filogenéticos construidos en base secuencias nucleotídicas del gen COI de individuos positivos a fitoplasmas y de referencia. A: Árbol filogenético construido con el método Máxima Verosimilitud; B: Árbol filogenético construido con el método Neighbor-Joining.

Identificación morfológica y/o molecular específica de los potenciales insectos vectores del fitoplasma 16SrXIII-F

La identificación molecular se utilizó debido a la disponibilidad de secuencias de la familia Cicadellidae procedentes de estudios previos del Laboratorio de Fitovirología, mientras que para las demás familias solo se pudo aplicar el método de identificación morfológica en base a referencias bibliográficas, por falta de informaciones en Genbank.

Superfamilia Fulgomorpha

Familia Cixiidae: *Códigos insectos:* PD11.8(F3) y PD6.10(1-2).

La determinación de la especie no fue posible puesto que no se encuentra descrita para el territorio nacional (Campodónico, 2021). Según el Dr. Juan Francisco Campodónico corresponde a una nueva especie para clasificar dentro del género *Cixiosoma*. Los registros fotográficos de *Cixiosoma* sp. se encuentran en la Figura 4. *Clasificación:* La clasificación de los ejemplares queda de la siguiente forma:

Familia: Cixiidae

Tribu: Cixiini

Género: *Cixiosoma*

Especie: *Cixiosoma* sp. (Nueva especie)

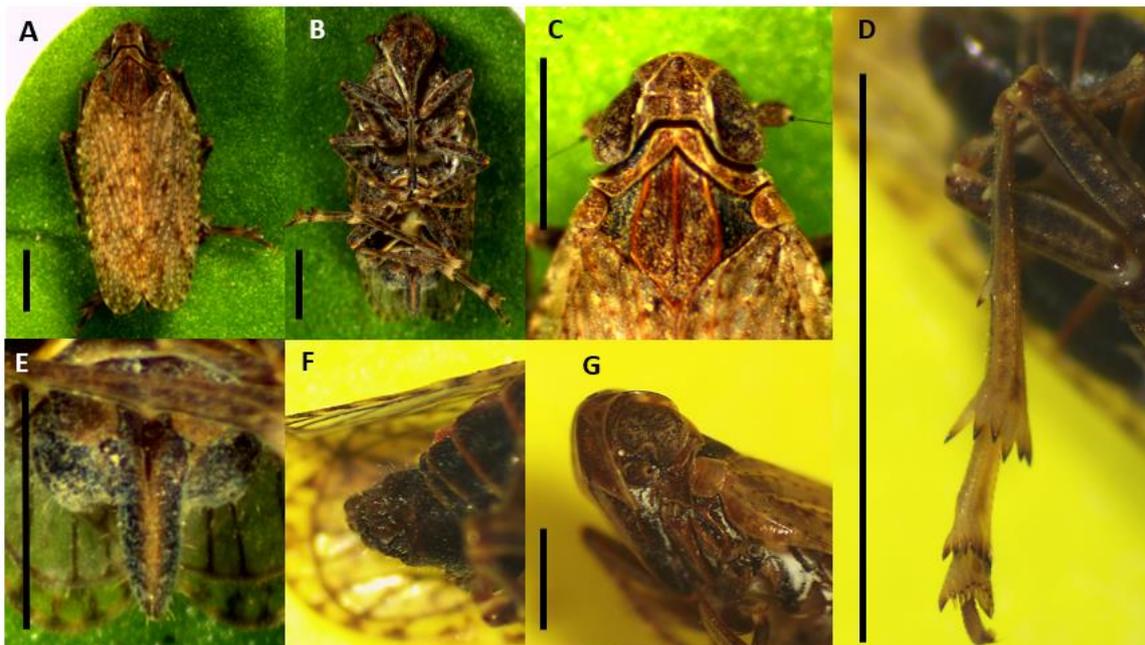


Figura 4. *Cixiosoma* sp. A-B: Cuerpo completo, vista dorsal y ventral; C: Cabeza, vista frontal; D: Pata; E: Aparato genital femenino; F: Aparato genital masculino; G: Cabeza, vista latera Escala: 1mm.

Familia Delphacidae: *Código insecto:* PD3.11(108). *Clasificación:* La clasificación del individuo fue realizada por el Dr. J.F. Campodónico y queda de la siguiente forma:

Familia: Delphacidae

Género: *Delphacodes*

Especie: *Delphacodes darwini*

El registro fotográfico del ejemplar se encuentra en la Figura 5. La descripción de la especie se encuentra en Muir (1929) [descripción original]; Campodónico (2017) [distribución, ilustración] y Campodónico (2021) [ejemplar macróptero].



Figura 5: *Delphacodes darwini*. Vista dorsal.

Superfamilia Membracoidea (Cicadellidae)

Análisis molecular: Se realizó un nuevo análisis para la clasificación molecular de cicadélidos utilizando secuencias del gen COI de especies de la familia Cicadellidae descritas en Quiroga *et al.*, 2020 (no publicadas). El nuevo árbol filogenético se encuentra en el Apéndice A1 y las distancias genéticas que se desprenden de él se encuentran en el Apéndice B4. Considerando que se trata de la misma especie cuando la identidad de secuencias del gen COI es igual o mayor al 97% (Zhang and Bu, 2022) los análisis mencionados permiten exponer lo siguiente:

Los individuos de esta familia se encuentran cercanos genéticamente a especies del género *Amplicephalus* (Dectocephalinae, Dectocephalini).

El cicadélido PD3.11(96) no tiene diferencias nucleotídicas del gen COI con la especie *Amplicephalus ornatus* y, por lo tanto, corresponde a la misma (Apéndice B4).

Los cicadélidos codificados como Pa(1A), Pa(1C) y Pa(4-4) presentan diferencias nucleotídicas de alrededor de un 2,1% con especies clasificadas dentro del género *Amplicephalus*, y por lo tanto se clasifican dentro del género (*Amplicephalus* sp.). Según la misma lógica, los tres individuos mencionados corresponderían a la misma especie con un 1,3% de diferencias nucleotídicas entre ellos (Apéndice B4).

Clasificación: PD3.11(96) corresponde a la especie *Amplicephalus ornatus*.

Pa(1A, 1C y 4-4) corresponden a una misma especie y se clasifican preliminarmente como *Amplicephalus* sp.

Pa(3-3) no tiene diferencias nucleotídicas del gen COI con Pa(6-2), (positivo a 16SrIII-J), por ende corresponden a la misma especie (Apéndice B4). Estos últimos, se encuentran en identificación y quedan de forma preliminar solo asociados a la familia Cicadellidae.

Los registros fotográficos de los ejemplares se encuentran en las Figuras 6, 7 y 8. Para asegurar la utilización de registros fotográficos de otros individuos se incluyeron sus secuencias en el análisis filogenético mencionado para la familia Cicadellidae (Apéndice B4).

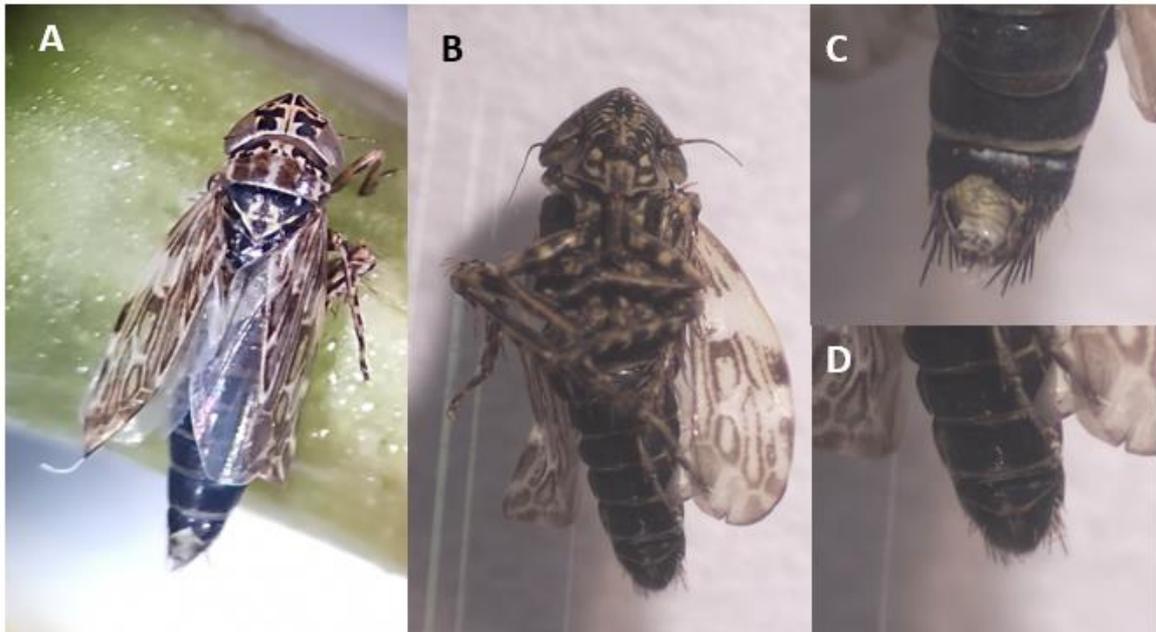


Figura 6: Pa(3-3). A-B: Vista dorsal y ventral de Pa(3-3); C y D: Vista dorsal y ventral de la zona genital de Pa(3-3).

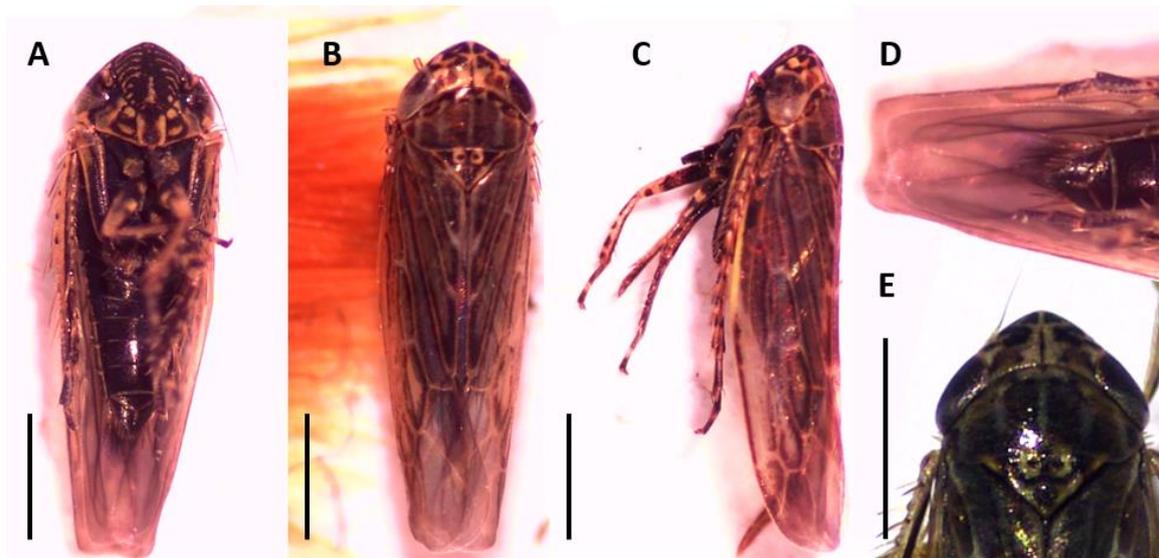


Figura 7: *Amplicephalus ornatus* (PD3.11(96)). A: Vista ventral; B: Vista dorsal; C: Vista lateral; D: Zona genital; E: Vista dorsal de la cabeza en detalle. Escala: 1mm.



Figura 8: Individuos clasificados como *Amplicephaus* sp.: A: Pa(1C) Vista ventral; B: Pa(1A) Vista dorso-lateral; C y D : Pa(4-4) Vista lateral y vista ventral de un corte de la zona genital.

Superfamilia Psylloidea

Familia Triozidae: *Códigos insectos:* Pa(4B), Pa(4C), Pa(D), Pa(D1) Pa(4L), Pa(4S), Pa(3-3), Pa(8-2), Pa(9-4), Pa(9-8), Pa(9-16), Pa(9-22), Pa(PC4-2), Pa(PC5-3), Pa(RP1-15), Pa(RP1-16) y Pa(RP3-17). Se incluye en la clasificación a Pa(4E y 4F) 16SrIII-J positivos.

Clasificación: Según los análisis filogenéticos, todos los ejemplares conforman un único grupo (Figura 3). Las secuencias nucleotídicas del gen COI son idénticas entre ellos, teniendo diferencias genéticas de entre 0-0,017%, según un análisis realizado para Psylloidea (Apéndice B5). La determinación de la especie fue realizada por el Dr. Juan Francisco Campodónico:

Familia: Triozidae

Género: *Trioza*

Especie: *Trioza berberidis*

La especie se encuentra descrita en Burckhardt (1988) como *Trioza berberidis* 'group'. El registro fotográfico de los individuos se muestra en la Figura 9.

Familia Liviidae:

1) *Código insecto:* PA(PMB7-25). *Clasificación:* La clasificación fue realizada por el Dr. Juan Francisco Campodónico y queda de la siguiente manera:

Familia: Liviidae

Género: *Nothoporina*

Especie: *Nothoporina* sp. (Se completará la clasificación a nivel de especie).

La descripción del género se encuentra en Burckhardt (1987) y el registro fotográfico se encuentra en la Figura 10.

2) *Código insecto:* Pa(4-2) y Pa(4-1).

Clasificación: El análisis filogenético indica que Pa(4-2) es cercano a *Nothoporina* sp. (PA(PMB7-25)) (Figura 3). Las distancias genéticas del gen COI superan el 3% entre ambos individuos mencionados, por lo tanto corresponden a dos especies diferentes (Apéndice B5). El registro fotográfico de los individuos se encuentra en la Figura 11.



Figura 9: *Trioza berberidis*. A: Vista dorsal; B: Vista ventral; C: Vista lateral; D: Genital masculino (gonoestilo en detalle); E: Ala derecha.

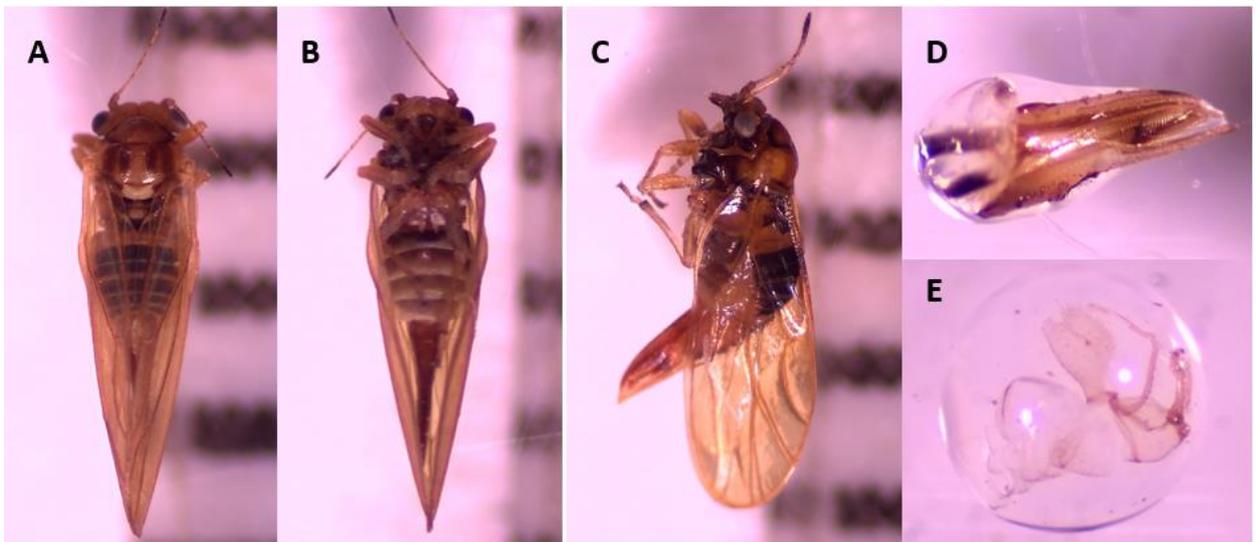


Figura 10. *Notophorina* sp. (PA(PMB7-25)). A: Vista dorsal; B: Vista ventral; C: Vista lateral; D: Genital femenino; E: Genital masculino.



Figura 11. Pa(4-2) y Pa(4-1). A y B: Pa(4-2) Vista ventral y dorsal; C: Pa(4-1) Vista lateral.

Resumen de los potenciales insectos vectores del fitoplasma 16SrXIII-F. Las especies y géneros de los insectos como potenciales vectores del fitoplasma en estudio, así como también la información asociada a su captura, se encuentra en el Cuadro 10.

Cuadro 10: Especies de potenciales insectos vectores e información asociada a ellos.

Código insecto	Origen	Especie vegetal	Superfamilia	Familia	Género/especie
PD11.8(F3) PD6.10(1-2)	Pichidegua	Mandarina	Fulgoroidea	Cixiidae	<i>Cixiosoma</i> sp.
PD3.11(108)			Fulgoroidea	Delphacidae	<i>Delphacodes darwini</i>
PD3.11(96)			Membracoidea	Cicadellidae	<i>Amplicephalus ornatus</i>
Pa(3-3)	Punta Arenas	Calafate	Membracoidea	Cicadellidae	Aún no clasificada
Pa(1A, 1C y 4-4)					<i>Amplicephalus</i> sp.
Pa(4B), Pa(4C), Pa(D), Pa(D1), Pa(4L), Pa(4S), Pa(3-3), Pa(8-2), Pa(9-4), Pa(9-8), Pa(9-16), Pa(9-22), Pa(PC4-2), Pa(PC5-3), Pa(RP1-15), Pa(RP1-16) y Pa(RP3-17)			Psylloidea	Triozidae	<i>Triozia berberidis</i>
Pa(4-1) y Pa(4-2)			Psylloidea	Liviidae	Aún no clasificada
PA(PMB7-25)			Lenga	Psylloidea	Liviidae

Hospederos vegetales

Muestreo, colecta e identificación de especies vegetales

En el muestreo se hallaron diferentes especies vegetales con sintomatología asociada a infecciones por fitoplasmas, tales como amarilleces y enrojecimiento foliares, disminución o aumento de la longitud de entrenudos, escobas de brujas, disminución del tamaño foliar, deformaciones de hoja, sobreproducción de brotes, filodia, enrojecimiento de tallos, defoliación (Figura 12). También se colectaron especies asintomáticas. Se colectaron en total 120 muestras vegetales de 19 familias taxonómicas. Existen un total de nueve muestras que se encuentran en identificación, por lo que el número de familias podría cambiar. Las especies colectadas y lugar de colecta se encuentran el Cuadro 11 y 12.

Cuadro 11: Muestra vegetales colectadas clasificadas por familias taxonómicas.

Familia	Sigla	N° muestras	Nombre común o científico
Apiaceae	Ap	1	Zanahoria silvestre (<i>Daucus carota</i>)
Asteraceae	A	7	<i>Baccharis patagonica</i> (1), <i>Sonchus</i> sp. (1), Romerillo (2), <i>Asteraceae</i> sp.(2), <i>Conyza</i> sp. (1)
Berberidaceae	Ber	39	Calafate (37), <i>Berberis</i> sp. (2)
Brassica	Bra	1	Yuyo (<i>Brassica rapa</i>)
Convolvulaceae	Cn	1	Correhuela (<i>Convolvulus arvensis</i>)
Cyperaceae	Cy	1	Chufa (<i>Cyperus eragostis</i>)
Ericaceae	E	7	Chaura (<i>Gaultheria</i> sp.)
Fabaceae	F	9	Retama (2), Arverjilla (2), Galega (5)
Geranaceae	Ge	2	Alfilerillo
Grossulaceae	G	8	Zarzaparrilla (<i>Ribes magellanicum</i>)
Myrtaceae	M	7	Murta (<i>Ugni molinae</i>)
Nothofagaceae	N	2	Lenga (<i>Nothofagus pumilio</i>)
Onagranaceae	O	1	<i>Epilobium</i> sp.
Poaceae	Poa	1	Pasto oவில் (<i>Dactylis glomerata</i>)
Polygonaceae	P	2	Quilo (<i>Muehlenbeckia hastulata</i>)
Proteaceae	Pro	1	Avellano (<i>Gevuina avellana</i>)
Rosaceae	Ro	13	Rosa enana(1), Frutilla (5), Frutilla blanca (4), zarzamora (3)
Rutaceae	R	6	Mandarino(5), Ruda (1)
Solanaceae	S	2	Tomatillo (1), Tomate cultivado (1)
Sin identificar	(?)	9	

Cuadro 12: Muestras vegetales colectadas clasificadas por origen y familia taxonómica.

Región	Comuna	N° Muestras	N° Familias	Familias colectadas (ver siglas en Cuadro 11)
O'Higgins	Litueche	17	8	F, Cy, A, R, S, Cn, Ge, Ro y (?)
	Pichidegua	23	8	A, Ap, Bra, F, Ge, S, P, O, Ro y (?)
Bío-Bío	Los Ángeles	3	2	Ro, Pro y (?)
	Contulmo	15	3	E, My Ro
Magallanes	Punta Arenas	62	7	Ber, A, N, G, F,Poa,E



Figura 12: Síntomas encontrados en terreno. A: Entrenudos cortos y reducción del tamaño de las hojas en zarzamora; B: Deformación foliar en tomate cultivado; C: Escoba de bruja en murta; D: Enrojecimiento en Alfilerillo; E: Filodia en planta de frutilla; F: Amarilleces en avellano chileno.

Detección de '*Candidatus Phytoplasma*' mediante nested-PCR para el gen 16S rRNA

Se analizaron por medio de nested-PCR un total de 120 muestras, de las cuales solo en tres se obtuvo amplificaciones, en duplicado. Lo anterior equivale al 2,5% del total de muestras vegetales analizadas (Cuadro 13).

Cuadro 13: Muestras vegetales que presentaron un producto de amplificación compatible con la presencia de fitoplasmas. Origen y método de extracción.

Código muestra	Origen	Especie	Método de extracción
FR70	Litueche	Frutilla (<i>Fragaria X ananassa</i>)	CTAB
FR71		Frutilla (<i>Fragaria X ananassa</i>)	CTAB
PC2	Punta Arenas	Lechuguilla (<i>Sonchus</i> sp.)	KIT

Análisis de secuencias de amplificaciones del gen de la subunidad ribosomal 16Sr para identificación de fitoplasmas

Con los resultados de la secuenciación se realizó un BLASTn en Genbank. Los resultados de las coincidencias obtenidas se registran en el Cuadro 14.

Cuadro 14. Identificación de los fitoplasmas presentes en las muestras vegetales a partir de la secuencia de los productos de amplificación (1250 pb).

Código muestra	Resultado Blastn 16Sr	Subgrupo Ribosomal	% Cobertura	% Identidad
FR70	<i>Fragaria X ananassa phyllody</i>	16SrXIII-F (CL5)	97	99,53
FR71	<i>Fragaria X ananassa phyllody</i>	16SrXIII-F (CL5)	99	99,28
PC2	' <i>Candidatus Phytoplasma pruni</i> '-related	16SrIII-B	95	99,81

Resumen del análisis de secuencias: Todas las secuencias correspondientes a fitoplasmas se analizaron también a través de RFLP *in silico* (datos no mostrados), confirmando la identificación de los fitoplasmas presentes en las tres muestras vegetales. Los fitoplasmas pertenecientes al subgrupo ribosomal 16SrXIII-F se detectaron en dos muestras, mientras que los pertenecientes al subgrupo 16SrIII-B se detectaron en una muestra.

Identificación de especies vegetales infectadas con fitoplasmas e información asociada a ellas

Rosaceae: *Códigos muestras:* FR70 y FR71 (Positivos a 16SrXIII-F)

Sintomatología: Filodia severa en el conocarpo y virescencia. Los registros fotográficos se encuentran en la Figura 13.

Clasificación: Especie: *Fragaria X ananassa*

Asteraceae: *Código muestra:* PC2 (Positivo a 16SrIII-B)

Sintomatología: Amarilleces foliares (Figura 13B) y enrojecimiento foliar (Figura 13C).

Clasificación: Especie: *Sonchus* sp. (En clasificación)



Figura 13. Registros fotográficos de muestras vegetales con detecciones positivas a fitoplasmas. A y D: Frutilla con filodia (Muestras FR70 y FR71); B, C y E: *Sonchus* sp. con enrojecimiento y amarilleces de las láminas foliares (Muestra PC2).

DISCUSIÓN

Los insectos vectores en su hábitat natural son capaces de adquirir más de un ‘*Candidatus Phytoplasma sp.*’ al momento de alimentarse desde una gama variada de plantas infectadas o bien desde plantas con infecciones mixtas (Rashidi *et al.*, 2014). En el presente estudio se ve reflejado lo anterior, en donde los ejemplares de la familia Triozidae y Cicadellidae capturados en la región de Magallanes y la Antártica Chilena, resultaron infectados por fitoplasmas de los subgrupos 16SrIII-J y 16SrXIII-F. En ningún caso se trató de infección mixta. La presencia del fitoplasma 16SrIII-J en insectos en la región de Magallanes y la Antártica Chilena corresponde a una nueva locación geográfica para su detección, así como también la familia de uno de sus nuevos potenciales vectores, la familia Triozidae. El mismo ‘*Ca. P. sp.*’ puede ser transmitido por varios insectos vectores, detectándose en estudios anteriores solo en especies de la familia Cicadellidae (Quiroga *et al.*, 2019; Quiroga *et al.*, 2020). Para un gran porcentaje de fitoplasmas conocidos a la fecha, aún no se han identificado las especies de insectos que pueden transmitirlos (Trivellone, 2019). Normalmente una especie de insecto puede transmitir una especie de fitoplasma. Sin embargo, va en aumento el número de trabajos que demuestran como algunos fitoplasmas pueden ser transmitidos por más de una especie de insecto que, además, pertenecen a diferentes familias e incluso superfamilias, como es el caso de los grupos ribosomales 16SrI y 16SrXII (Trivellone and Dietrich, 2021).

Así como ocurrió con los grupos 16SrI y 16SrXII, se detectó la presencia del agente etiológico de la enfermedad *StrPh* dentro de tres diferentes superfamilias del orden Hemiptera, estas fueron: Fulgoroidea, Psylloidea y Membracoidea. Aun cuando las circunstancias parecen indicar una posible vectorización de múltiples familias, existe evidencia que estas bacterias patógenas pueden llegar a infectar a hemípteros, pero estos son incapaces de transmitirlos a huéspedes vegetales y por lo tanto se convierten en hospederos sin salida para el fitoplasma, como en el caso de 16SrV-D con *Ricania speculum* (Walker) (Galletto *et al.*, 2019). La realización de las pruebas de transmisión permitirá resolver la interrogante de si se trata efectivamente de vectores competentes, portadores sin salida o una detección fortuita, puesto que, cualquier insecto que se alimenta de una planta infectada puede resultar positivo, ya que el fitoplasma puede presentarse en cualquier parte de su tracto digestivo, y por ende no correspondería a un vector ni a un huésped terminal (Weintraub y Beanland, 2006). La confirmación de lo anterior se plantea como una perspectiva futura para las especies encontradas en este estudio exceptuando *Cixiosoma sp.*, para el cual ya se ha corroborado su idoneidad de transmitir el fitoplasma 16SrXIII-F (Datos no publicados).

La identificación de especies de insectos se basa comúnmente en la realización de análisis comparativos de las secuencias de gen COI. No obstante, la información dirigida hacia la investigación de la divergencia genética en Insecta es limitada. A causa de ello, la clasificación de los potenciales insectos vectores por esta vía se vio dificultada. Los porcentajes de identidad con las especies de referencia en Genbank no superaron el 88%, muy por debajo del punto de corte que es el 97% (Zhang y Bu, 2022). Esto significa que por porcentaje de identidad nucleotídica $\geq 97\%$, los individuos en comparación pertenecen a una misma especie de insecto. Para un gen mitocondrial el 3% (100-97%), se considera un valor alto, lo cual puede incluso conducir a la fusión de especies, mientras que con valores menores

al 3%, se corre el riesgo de que una misma especie se fraccione en dos o más, sobrestimando la diversidad. Para evitar estas situaciones, los autores recomiendan el uso de un umbral óptimo que responda a taxones específicos. Al analizar 4288 géneros encontraron que el umbral óptimo para la delimitación de especies congénicas oscilaba entre 0,001 y 0,1590% (84,1-99,9%), detallando un umbral óptimo para cada uno de ellos. Pese a esto, los mismos informan, por ejemplo, para el género *Amplicephalus* un valor de 0.101 (89,9%) para la delimitación. En base a esto, el presente estudio reconocería a varias especies en clasificación como una. Sin embargo, en la investigación se deja en claro que realizaron el análisis sobre géneros con números de especies mayores o iguales a tres, por lo que la falta de especies con secuencias disponibles del gen para el género en cuestión pudo haber determinado un umbral inadecuado. Lo anterior llevó a la utilización de la distancia preliminar.

La fauna de hemípteros que habita Chile posee información limitada del gen COI. Los vacíos en las bases de datos no permiten una evaluación exacta de la especie en base al análisis del gen. Por consiguiente, complementar con datos morfológicos se vuelve relevante en el proceso (Padial *et al.*, 2010). Sin embargo, los principales registros que contienen a la fauna de hemípteros datan del siglo pasado y consisten en claves altamente específicas e ilustraciones (Burckhardt, 1987; 1988; Linnavuori and DeLong, 1977), exceptuando la superfamilia Fulgoroidea en donde existe información contingente (Campodónico, 2020; 2021). En vista de lo anterior, la identificación de las especies potenciales vectores del fitoplasma 16SrXIII-F se volvió extensa y laboriosa. Debido a ello, proporcionar nuevas informaciones sobre los códigos de barras de ADN basados en el gen COI tiene un enorme potencial para avanzar en el conocimiento de las especies presentes en Chile, ya que se considera un sistema simple y rápido de identificación que es aplicable para usos comerciales, agrícolas, epidemiológico, para el monitoreo de plagas ambientales y de conservación (Zhang and Bu, 2022).

No se tuvo éxito al encontrar especies vegetales que estuviesen actuando como reservorio del fitoplasma 16SrXIII-F. Madariaga y Ramírez (2019) indicaron como huésped del patógeno a *B. microphylla*, especie desde la cual provienen cuatro de los ocho potenciales vectores encontrados en este estudio. Si bien su captura fue directamente desde calafate, no se puede descartar la probabilidad de que hayan adquirido el patógeno desde otras especies vegetales dado sus hábitos polípagos. Lo anterior se sugiere dado la nula detección de fitoplasmas en calafate u otras especies vegetales asociadas a los insectos infectados.

Existen diversos factores que pudieron haber dificultado la detección de fitoplasmas en especies vegetales, entre ellos, la modalidad de obtención de ácidos nucleicos. Para la aplicación de métodos moleculares se requiere del uso de ácidos nucleicos de alta calidad, puesto que desde el ADN total extraído, solo una pequeña cantidad corresponde al fitoplasma (Bertaccini y Duduk, 2009; Nath *et al.*, 2022). Junto con lo anterior, considerar incluir una etapa de enriquecimiento de ADN de fitoplasma en el protocolo de extracción para asegurar una mayor probabilidad de detección puede ser fundamental, tal como mencionan Madariaga y Ramírez (2019) en el caso del 16SrXIII-F en calafate.

La calidad del ADN sigue siendo un cuello de botella para procesos clave en la detección de estos patógenos en especies vegetales, debido a que existen compuestos que dificultan su extracción como la lignina, fenoles, polisacáridos y flavonoides. Estos se unen al ADN de manera irreversible, coprecipitan y lo secuestran, lo cual afecta los análisis moleculares por la inhibición de la polimerasa y comprometen la calidad necesaria para la secuenciación de los fragmentos amplificados (Nath *et al.*, 2022; Vaillancourt y Buell, 2019; Vilanova *et al.*,

2020). Estos compuestos inhibidores de la polimerasa se encuentran presentes en altas concentraciones en especies como calafate, lenga, chaura y en otras especies analizadas en el estudio, que presentaron síntomas o se asociaron a insectos positivos (Gómez-Pérez *et al.*, 2022; Gyeltshen *et al.*, 2022; Mieres-Castro *et al.*, 2019; Ruiz *et al.*, 2010).

La distribución errática en la planta, la fluctuación estacional y la baja concentración de los fitoplasmas se suman a los factores que dificultan su detección. En diferentes estudios se han encontrado patrones estacionales marcados que registraran acumulaciones diferenciales entre tejidos en diferentes etapas del desarrollo de las especies vegetales, así como también épocas en que los fitoplasmas son difícilmente detectables por medio de PCR (Bulgari *et al.*, 2014; Wright *et al.*, 2022). Esto conlleva a la necesidad de desarrollar ensayos anuales para definir cuál es la mejor época del año para la toma de muestras en las diferentes localidades.

Para enfrentar las problemáticas abordadas en este estudio, la literatura sugiere varias estrategias tales como: Utilización de más un método de extracción de ácidos nucleicos (Bahder *et al.*, 2018); uso de un tercer par de partidores entre ambas amplificaciones del nested o la detección con partidores para genes diferentes a los ribosomales (Wally *et al.*, 2008; Martini *et al.*, 2019); aplicación y desarrollo de nuevas técnicas moleculares de detección altamente sensibles y específicas (Shreenath *et al.*, 2022); modificación de protocolos adaptados a especies objetivo (Reddy and Rao, 2022); incorporación de técnicas de visualización microscópica para la detección preliminar (Arismendi *et al.*, 2010), entre otras.

Adaptar protocolos y métodos para cada especie requiere de una mano de obra extensa (Nath *et al.*, 2022), es por esto que en el presente trabajo se optó por la utilización de estrategias de rápida aplicación. Se decidió entonces utilizar partidores que amplifican el gen *tuf* en un número acotado de muestras vegetales con sintomatología asociada a infecciones por fitoplasma. Con lo anterior, se obtuvieron falsos positivos ya que las amplificaciones obtenidas correspondieron a otras especies bacterianas propias de la microbiota de cada especie (Datos no presentados). De igual forma ocurrió con el uso de los partidores “universales” para el gen 16S RNA, principalmente en insectos y en una muestra vegetal (Apéndice B7). Adicionalmente, en una etapa tardía del estudio, se probaron otras técnicas de extracción de ácidos nucleicos. La utilización del kit de extracción GeneAll® Exgene™ Plant SV entregó una mayor cantidad de bandas amplificadas al análisis nested-PCR. Sin embargo, estas resultaron ser falsos positivos ya que las secuencias de los fragmentos amplificados nunca coincidieron con las de fitoplasmas. No asombra del todo este resultado, en cuanto es conocido que los partidores utilizados para la detección de fitoplasmas, también pueden amplificar regiones de otras bacterias presentes en las muestras. Por otro lado, es efectivamente posible que los fitoplasmas no estén presentes en las muestras vegetales analizadas y que es posible que los síntomas presentados se deban a otros factores tanto bióticos como abióticos, lo que requiere una mayor investigación.

Es importante señalar que el método de extracción mencionado en el párrafo anterior logró la detección del fitoplasma perteneciente al subgrupo ribosomal 16SrIII-B, en una muestra de la especie de la familia Asteraceae colectada en Punta Arenas. El fitoplasma se encuentra distribuido ampliamente en Argentina, afectando cultivos de tomate, duraznero y a las especies ornamentales *M. azedarach* y *C. gilliesii* (Fernández *et al.*, 2013; Galdeano *et al.*, 2013), mientras que en Brasil se ha encontrado en naranjos con sintomatología similar a la causada por HLB (Wulff *et al.*, 2019), además de otras detecciones (Rao *et al.*, 2018). Esta corresponde a la primera detección del subgrupo ribosomal 16SrIII-B en el territorio nacional, por lo que será necesario la evaluación de la prevalencia de este nuevo patógeno en el área de

la recolección de la muestra vegetal. Asimismo, se debe realizar estimaciones de las posibles pérdidas que podría ocasionar su presencia, considerando los daños reportados en otros países, con el fin de planificar estrategias que minimicen su impacto.

CONCLUSIONES

Con la metodología y condiciones en las que se realizó el presente estudio, los resultados obtenidos permiten señalar lo siguiente:

- Existen al menos 8 diferentes especies de potenciales insectos vectores del fitoplasma 16SrXIII-F en Chile, distribuidos entre las superfamilias Psylloidea (3), Membracoidea (3) y Fulgoroidea (2).
- *Trioza berberidis* (Familia Triozidae) es potencial vector de los fitoplasmas 16SrXIII-F y 16SrIII-J.
- El presente corresponde al primer informe acerca de potenciales insectos vectores asociados al fitoplasma 16SrXIII-F y la primera detección del fitoplasma 16SrIII-J en un insecto de una familia diferente a Cicadellidae.
- Falta información molecular asociada a la fauna de insectos nativos requerida para la identificación de especies, así como también especialistas en la clasificación de estos en familias taxonómicas asociadas a vectores de fitoplasmas.
- No se encontraron especies vegetales espontáneas hospederas del fitoplasma 16SrXIII-F.
- *Sonchus* sp. es hospedero del fitoplasma 16SrIII-B y esta corresponde a la primera detección del fitoplasma en Chile.

LITERATURA CITADA

- Arismendi, N., N. Andrade, R. Riegel and R. Carrillo. 2010. Presence of a phytoplasma associated with witches' broom disease in *Ugni molinae* Turcz. and *Gaultheria phillyreifolia* (Pers.) Sleumer determined by DAPI, PCR, and DNA sequencing. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 70(1): 26-33.
- Arismendi, N. L., R. Riegel and R. Carrillo. 2014. In Vivo Transmission of '*Candidatus Phytoplasma ulmi*' by *Amplicephalus curtulus* (Hemiptera: *Cicadellidae*) and Its Effect on Ryegrass (*Lolium multiflorum* Cv. Tama). *Journal of economic entomology*, 107(1): 83-91.
- Bahder, B. W., E. Helmick, D. Mou, N. Harrison, and R. Davis. 2018. Digital PCR technology for detection of palm-infecting phytoplasmas belonging to group 16SrIV that occur in Florida. *Plant Disease*, 102(5): 1008-1014.
- 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
- Bertaccini, A., and B. Duduk. 2009. Phytoplasma and phytoplasma diseases: a review of recent research. *Phytopathologia Mediterranea* 48:355-378.
- Bertaccini, A., and M. Lee. 2018. Phytoplasmas: an update.p. 1-29. *In: Phytoplasmas: plant pathogenic Bacteria Vol- I Springer, Singapore.*
- Bourgoin, T. 2021. FLOW (Fulgoromorpha Lists on The Web): a world knowledge base dedicated to Fulgoromorpha. Version 8. [en línea]. Paris, France: Muséum National d'Histoire Naturelle. Disponible en: <<https://flow.hemiptera-databases.org/flow/>>. Consultado el 24 de abril de 2022.
- Bulgari, D., P. Casati, F. Quaglino and P. Bianco. 2014. Endophytic bacterial community of grapevine leaves influenced by sampling date and phytoplasma infection process. *BMC microbiology*, 14(1): 1-11.
- Burckhardt, D. 1987. Jumping plant lice (Homoptera: Psylloidea) of the temperate neotropical region. Part 2: Psyllidae (subfamilies Diaphorininae, Acizziinae, Ciriacreminae and Psyllinae). *Zoological Journal of the Linnean Society*,90(2): 145-205.
- Burckhardt, D. 1988. Jumping plant lice (Homoptera: Psylloidea) of the temperate neotropical region. Part 3: Calophyidae and Triozidae. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 92(2):115-191.
- Campodónico, J. F. 2017. New distributional records of Delphacidae (Hemiptera: Fulgoroidea) from Chile. *Archivos Entomológicos*, (17):119-128.
- Campodónico, J. F. 2021. Los Fulgoroidea (Hemiptera: Auchenorrhyncha) de Chile. *Revista Chilena de Entomología*, 47(4).
- Cui, W., N. Quiroga, T. Curkovic, A. Zamorano and N. Fiore. 2019. Detection and identification of 16SrXIII-F and a novel 16SrXIII phytoplasma subgroups associated with strawberry phyllody in Chile. *European Journal of Plant Pathology*, 155(3): 1039-1046.
- Deng, S., and C. Hiruki. 1991. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and nonculturable mollicutes. *Journal of microbiological methods*, 14(1): 53-61.

- Duduk, B., J. Stepanović, A. Yadav and G. P. Rao. 2018. Phytoplasmas in weeds and wild plants. p. 313-345. *In: Phytoplasmas: Plant pathogenic Bacteria*. Vol. I. Springer, Singapore.
- Fennah, R.G. 1965. Fulgoroidea from southern Chile (Hemiptera). *Bulletin of the British Museum (Natural History). Entomology*, 17(6): 233-272.
- Fernández, F., F. Guzmán, V. Curzel, N. Bejarano, and L. Conci. 2013. Detection and molecular characterization of a phytoplasma affecting *Prunus persica* L. in Jujuy, Argentina. *European journal of plant pathology*, 135(4): 627-631.
- Fiore, N., S. Prodan, S. Paltrinieri, A. Gajardo, S. Botti, A.M. Pino and A. Bertaccini. 2007. Molecular characterization of phytoplasmas in Chilean grapevines. *Bulletin of Insectology*, 60(2): 331.
- Fiore N, A. Zamorano, AM Pino. 2015. Identification of phytoplasmas belonging to the ribosomal groups 16SrIII and 16SrV in Chilean grapevines. *Phytopathogenic Mollicutes* 5(1):32-36
- Galetto, L., M. Pegoraro, C. Marzachi, E. Rossi, A. Lucchi and D. Bosco. 2019. Potential role of the alien planthopper *Ricania speculum* as vector of Flavescence dorée phytoplasma. *European Journal of Plant Pathology*, 154(4):1103-1110.
- Galdeano, E., F. Guzmán, F. Fernández, and L. Conci. 2013. Genetic diversity of 16SrIII group phytoplasmas in Argentina. Predominance of subgroups 16SrIII-J and B and two new subgroups 16SrIII-W and X. *European Journal of Plant Pathology*, 137(4): 753-764.
- Gasparich, G. E. 2010. Spiroplasmas and phytoplasmas: microbes associated with plant hosts. *Biologicals*, 38(2): 193-203.
- Gómez-Pérez, L., N. Moraga, K. Ah-Hen, A. Rodrigue and A. Vega-Gálvez. 2022. Dietary fibre in processed murta (*Ugni molinae* Turcz) berries: bioactive components and antioxidant capacity. *Journal of Food Science and Technology*, 1:9.
- Gonzalez, F., A. Zamorano, A. M. Pino, S. Paltrinieri, A. Bertaccini and N. Fiore. 2011. Identification of phytoplasma belonging to X-disease group in cherry in Chile. *Bulletin of Insectology*, 64(Supplement): S235-S236.
- Gundersen, D. E., and Lee, I. M. 1996. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathologia Mediterranea*, 35: 114–151.
- Gupta, R. S., S. Sawhani, M. Adeolu, S. Alnajjar and A. Oren. 2018. Phylogenetic framework for the phylum Tenericutes based on genome sequence data: proposal for the creation of a new order Mycoplasmoidales ord. nov., containing two new families Mycoplasmoidaceae fam. nov. and Metamycoplasmataceae fam. nov. harbouring Eperythrozoon, Ureaplasma and five novel genera. *Antonie van Leeuwenhoek*, 111(9): 1583-1630.
- Gyeltshen, T., Jordan, G. J., Smith, J. A., & Bissember, A. C. 2022. Natural products isolation studies of the paleoendemic plant species *Nothofagus gunnii* and *Nothofagus cunninghamii*. *Fitoterapia*, 156:105088.
- Hepp, R. y M. Vargas. 2002. Detección por PCR del agente causal de la marchitez amarilla de la remolacha en cicadélidos (Homóptera: Cicadellidae) asociados al cultivo de la remolacha. *Fitopatología*, 37: 67-108.
- Himeno, M., Y. Neriya, N. Minato, C. Miura, K. Sugawara, Y. Ishii, and S. Namba. 2011. Unique morphological changes in plant pathogenic phytoplasma-infected petunia flowers are related to transcriptional regulation of floral homeotic genes in an organ-specific manner. *The Plant Journal*, 67(6): 971-979.

- INDAP. 2015. INDAP Extensión rural: Berries. Manual de cultivo de Frambuesas y Frutillas en Chile. Disponible en <https://www.indap.gob.cl/extensi%C3%B3n-rural/producci%C3%B3n-agr%C3%ADcola/berries> (Consultado en mayo del 2021).
- Lee, I. M., R. E. Davis, and D. E. Gundersen-Rindal. 2000. Phytoplasma: phytopathogenic mollicutes. *Annual Reviews in Microbiology*, 54(1): 221-255.
- Linnavuori, R., and DeLong, D. M. 1977. The leafhoppers (Homoptera: Cicadellidae) known from Chile. *Brenesia*, 12(13): 163-267.
- Longone, V., F. Gonzalez, A. Zamorano, A. M. Pino, J. Araya, V. Diaz, and N. Fiore. 2011. Epidemiological aspects of phytoplasmas in Chilean grapevines. *Bulletin of Insectology*, 64(Supplement): S91-S92.
- Madariaga, M., and I. Ramírez. 2019. Identification of a phytoplasma associated with witches' broom symptoms in calafate (*Berberis microphylla* G. Forst.). *Chilean journal of agricultural research*, 79(3): 493-498.
- Malinovski T. 1997. Silicacapture-reverse transcription-polymerase chain reaction (SC-RT-PCR): application for the detection of several plant viruses. *Proceedings of IV International Symposium of the European Foundation for Plant Pathology*, Dordrecht, Netherlands, 445-448.
- Martini, M., K. Bottner-Parker, and I. Lee. 2019. PCR-based sequence analysis on multiple genes other than 16s rRNA gene for differentiation of phytoplasmas. In *Phytoplasmas* (pp. 97-115). Humana Press, New York, NY.
- Mieres-Castro, D., G. Schmeda-Hirschmann, C. Theoduloz, S. Gómez-Alonso, J. Pérez-Navarro, K. Márquez, F. Jiménez-Aspee. 2019. Antioxidant activity and the isolation of polyphenols and new iridoids from Chilean *Gaultheria phillyreifolia* and *G. poeppigii* berries. *Food chemistry*, 291: 167-179.
- Muir, F.A.G. 1929. New and little-known South-American Delphacidae (Homoptera, Fulgoroidea) in the collection of the British Museum. *Journal of Natural History*, 3(13): 75-85,
- Nath, O., S. Fletcher, A. Hayward, L., Shaw, R. Agarwal, A. Furtado, R. Henry and N. Mitter. 2022. A Comprehensive High-Quality DNA and RNA Extraction Protocol for a Range of Cultivars and Tissue Types of the Woody Crop Avocado. *Plants*, 11(3): 242.
- Nejat, N. and G. Vadamalai. 2013. Diagnostic techniques for detection of phytoplasma diseases: past and present. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 120(1): 16-25.
- ODEPA. 2014. ODEPA Artículos, Semilleros, bulbos y viveros. Una mirada al sector de viveros en Chile. Disponible en <https://www.odepa.gob.cl/publicaciones/articulos/una-mirada-al-sector-viveros-en-chile-octubre-de-2014> (Consultado en mayo del 2021).
- Oshima, K., K. Maejima and S. Namba. 2013. Genomic and evolutionary aspects of phytoplasmas. *Frontiers in microbiology*, 4:230.
- Padial, J. M., Miralles, A., De la Riva, I and Vences, M. 2010. The integrative future of taxonomy. *Frontiers in zoology*, 7(1); 1-14.
- Porebski, S., L. G. Baile and B. R. Baum. 1997. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Molecular Biology Reporter*, 15: 8-15.
- Quiroga, N., C. Gamboa, G. Medina, N. Contaldo, F. Torres, A. Bertaccini, A. Zamorano and N. Fiore. 2021. Survey for 'Candidatus Liberibacter' and 'Candidatus Phytoplasma' in Citrus in Chile. *Pathogens*, 11(1):48.
- Quiroga, N., C. Gamboa, D. Soto, A.M. Pino, A. Zamorano, J. Campodonico, A. Alma, A. Bertaccini, N. Fiore. 2020. Update and new epidemiological aspects about Grapevine Yellows in Chile. *Pathogens* 9: 933, doi:10.3390/pathogens9110933

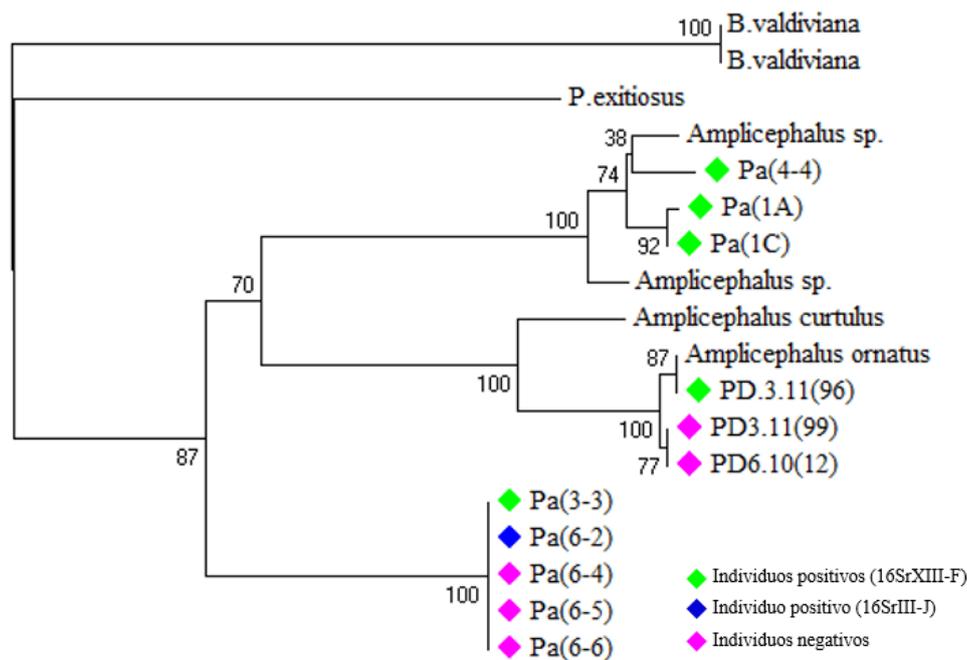
- Quiroga N., V. Longone, X. González, A. Zamorano, A. M. Pino, L. Picciau, A. Alma. S. Paltrinieri, N. Contaldo, A. Bertaccini and N. Fiore. 2019. Transmission of 16SrIII-J phytoplasmas by the leafhoppers *Paratanus exitiosus* and *Bergallia valdiviana*. *Phytopathologia Mediterranea*, 58: 231-237.
- Rashidi, M., R. D'amelio, L. Galetto, C. Marzachì and D. Bosco. 2014. Interactive transmission of two phytoplasmas by the vector insect. *Annals of Applied Biology*, 165(3), 404-413.
- Rao, G. P., E. Alvarez, and A. Yadav. 2018. *Phytoplasmas: Plant Pathogenic Bacteria*. Springer.
- Rao, G. P., T. Madhupriya, R. Manimekalai, A. Tiwari and A. Yadav. 2017. A century progress of research on phytoplasma diseases in India. *Phytopathogenic Mollicutes*, 7(1): 1-38.
- Reddy, M., and G. Rao. 2022. Duplex PCR assay for detection of chickpea chlorotic dwarf virus and peanut witches' broom phytoplasma in chickpea. *3 Biotech*, 12(1): 1-5.
- Rott M.E. and Jelkman W. 2001. Characterization and detection of several filamentous viruses of cherry: Adaptation of an alternative cloning method (DOP-PCR) and modification of an RNA extraction protocol. *European Journal of Plant Pathology* 107: 411–420.
- Ruiz, A., I. Hermosin-Gutierrez, C. Mardones, C. Vergara, E. Herlitz, M. Vega, C. Dorau, P. Winterhalter, and D. von Baer. 2010. Polyphenols and antioxidant activity of calafate (*Berberis microphylla*) fruits and other native berries from Southern Chile. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(10): 6081-6089.
- Schaff, D., M. Lee, and R. E. Davis. 1992. Sensitive detection and identification of mycoplasma-like organisms in plants by polymerase chain reactions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 186(3): 1503-1509.
- Shreenath, Y., S. Sunani, G. Rao, and M. Dickinson. 2022. Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the detection of clover proliferation phytoplasma-associated with sweet cherry witches' broom disease. *Australasian Plant Pathology*, 1-8.
- Smart, C. D., B. Schneider, C. L. Blomquist, L. J. Guerra, N. A. Harrison, U. Ahrens and B. C. Kirkpatrick. 1996. Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of the 16S-23S rRNA spacer region. *Applied and environmental microbiology*, 62(8): 2988.
- Trivellone, V. 2019. An online global database of Hemiptera-Phytoplasma-Plant biological interactions. *Biodiversity Data Journal*, (7).
- Trivellone, V., and C. H. Dietrich. 2021. Evolutionary Diversification in Insect Vector–Phytoplasma–Plant Associations. *Annals of the Entomological Society of America*, 114(2): 137-150.
- Vaillancourt, B., and C. Buell. 2019. High molecular weight DNA isolation method from diverse plant species for use with Oxford Nanopore sequencing. *BioRxiv*, 783159.
- Vilanova, S., D. Alonso, P. Gramazio, M. Plazas, E. García-Fortea, P Ferrante, M. Schmidt, M. Diez, B. Usadel, G. Giuliano, and J. Prohens 2020. SILEX: a fast and inexpensive high-quality DNA extraction method suitable for multiple sequencing platforms and recalcitrant plant species. *Plant Methods*, 16(1): 1-11.
- Vrijenhoek, R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol*, 3(5): 294-9.
- Weintraub, P. G., and L. Beanland. 2006. Insect vectors of phytoplasmas. *Annu. Rev. Entomol.*, 51: 91-111.
- Wally, O., A. El Hadrami, A. Khadhair, L. Adam, T. Shinnars-Carnelley, B. Elliott, and F. Daayf. 2008. DNA sequencing reveals false positives during the detection of aster yellows phytoplasmas in leafhoppers. *Scientia horticultrae*, 116(2): 130-137.

- Wright, A., M. Shires, C. Molnar, G. Bishop, A. Johnson, C. Frias, and S. Harper. 2022. Titer and Distribution of Candidatus Phytoplasma pruni in Prunus avium. Phytopathology.
- Wulff, N., C. Fassini, V. Marques, E. Martins, D. Coletti, D. Teixeira, M. Sanches and J. Bové. 2019. Molecular characterization and detection of 16SrIII group phytoplasma associated with Huanglongbing symptoms. Phytopathology, 109(3): 366-374.
- Zamorano, A., X. González, A. M. Pino, N. Quiroga and N. Fiore. 2015. Detection of 16SrIII-J phytoplasma in Galega officinalis L., a weed commonly associated to pome fruit orchards in Chile. Phytopathogenic Mollicutes, 5(1s): S115-S116.
- Zhang, H., and Bu, W. 2022. Exploring Large-Scale Patterns of Genetic Variation in the COI Gene among Insecta: Implications for DNA Barcoding and Threshold-Based Species Delimitation Studies. Insects, 13(5): 425.
- Zhao, Y., and R. E. Davis, R. E. 2016. Criteria for phytoplasma 16Sr group/subgroup delineation and the need of a platform for proper registration of new groups and subgroups. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 66(5): 2121-2123.

APÉNDICE

Apéndice A. Figuras complementarias

A1: Árbol filogenético construido con el método Neighbor-Joining en base secuencias nucleotídicas del gen COI de individuos (insectos) positivos y negativos para la detección de fitoplasmas y especies identificadas en Quiroga *et al.* (2020).



Apéndice B. Cuadros Complementarios

B1: Fechas de envíos de muestras vegetales e insectos desde Punta Arenas.

N° de Envío	Fecha
1	8 de enero
2	4 de marzo
3	10 de marzo
4	8 de abril
5	5 de mayo
6	17 de septiembre

B2: Lugares visitados en la salida a terreno a Punta Arenas, Región de Magallanes y la Antártida chilena en enero del 2022.

Día de visita	Lugares visitados	Referencia
4 enero	Parque María Behety, Instituto de la Patagonia y Camino General del Canto	Zona urbana P.A
5 de enero	Cruce General Phillipe, Cabeza del Mar, Río Pescado y Parque Chabunco	Noreste de Punta Arenas
6 de enero	Fuerte Bulnes, Puerto del hambre, Cruce Rinconada, Río Agua Fresca, Huairavo, Río amarillo y Río blanco	Suroeste de Punta Arenas

B3. Combinación de métodos de extracción de material genéticos utilizados en muestras vegetales específicas.

Métodos	Muestras	Especie
TNA-CTAB	PMB(2), PMB(4C), CGN(4)	Calafate (<i>B. microphylla</i>)
	PMB(4R) y PMB(5)	Romerillo (<i>Chilotrimum diffusum</i>)
	PMB7	Lenga (<i>Nothofagus pumilio</i>)
	FB5	Chaura (<i>Gaultheria</i> sp.)
	FB6	<i>Berberis buxifolia</i>
KIT-CTAB	PMB6	Lenga (<i>Nothofagus pumilio</i>)
	PMB10	Calafate (<i>B. microphylla</i>)
	PC1	Pasto Ovillo (<i>Dactylis glomerata</i>)
	PC2	Lechuguilla (<i>Sonchus</i> sp.)

B4: Distancias genéticas obtenidas desde el análisis del gen COI entre individuos de la familia Cicadellidae capturados en el presente estudio y otras especies identificadas en investigaciones asociadas a aspectos epidemiológicos de fitoplasmas en Chile.

		Distancias genéticas de cicadélidos capturados y especies identificadas																	
Nombres / códigos		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1	Amplicephalus sp.																		
2	A. ornatus	0.10																	
3	B. valdiviana		0.15																
4	A. curtulus			0.16															
5	Amplicephalus sp.				0.031														
6	P. exitiosus					0.08													
7	B. valdiviana						0.13												
8	Pa(1A)							0.15											
9	Pa(1C)								0.17										
10	Pa(3-3)									0.02									
11	Pa(4-4)										0.02								
12	Pa(6-2)											0.02							
13	Pa(6-4)												0.09						
14	Pa(6-5)													0.09					
15	Pa(6-6)														0.09				
16	PD.3.11(96)															0.09			
17	PD3.11(99)																0.00		
18	PD6.10(12)																	0.00	

*Los códigos en celda color verde corresponden a individuos positivos 16SrXIII-F.

*El código en celda color azul corresponde a un individuo positivo 16SrIII-J.

*Celdas color anaranjado corresponden a individuos con resultados negativos al análisis de detección de fitoplasmas.

*Los individuos numerados del 1-7 corresponden especies identificadas en (Quiroga *et al.*, 2020).

*Las celdas con distancias genéticas marcadas en verde indican que corresponde a la misma especie, mientras que en color amarillo indica que se encuentra en el límite propuesto en el presente (3%) según lo expuesto en Zhang and Bu, (2022) para una clasificación preliminar en base a un gen mitocondrial.

B5: Distancias genéticas obtenidas desde el análisis del gen COI entre individuos de la familia

	Nombres/Código insectos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	Pa(4F)														
2	Pa(4B)	0.00													
3	Pa(4C)	0.00	0.00												
4	Pa(4L)	0.01	0.01	0.01											
5	Pa(8-2)	0.00	0.00	0.00	0.01										
6	Pa(PC4-2)	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00									
7	Pa(PC5-3)	0.01	0.01	0.01	0.017	0.01	0.01								
8	Pa(RP1-15)	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.01							
9	Pa(RP3-17)	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.01	0.00						
10	KY294167.1Trioza_urticae	0.29	0.29	0.29	0.31	0.29	0.29	0.31	0.29	0.29					
11	KY294162.1Trioza_remota	0.20	0.20	0.20	0.22	0.21	0.21	0.23	0.21	0.21	0.23				
12	MT980802.1P.discrepans	0.34	0.34	0.34	0.34	0.34	0.34	0.37	0.34	0.34	0.27	0.26			
13	MG988723.1D. citri	0.35	0.35	0.35	0.38	0.36	0.36	0.38	0.36	0.36	0.38	0.30	0.24		
14	Pa(4-2)	0.47	0.47	0.47	0.48	0.46	0.46	0.49	0.46	0.46	0.37	0.46	0.34	0.36	
15	PA(PMB7-25)	0.38	0.38	0.38	0.39	0.38	0.38	0.41	0.38	0.38	0.40	0.38	0.29	0.30	0.22

Trioziidae y Liviidae capturados en el presente estudio y otras especies de referencia.

*Los códigos en celda color verde corresponden a individuos positivos a 16SrXIII-F y en azul corresponde a un individuo positivo 16SrIII-J.

*Los individuos numerados del 10-13 corresponden registros de especies en Genbank.

*Las celdas con distancias genéticas marcadas en verde indican que corresponde a la misma especie dado el límite propuesto en el presente estudio (3%) según lo expuesto en Zhang and Bu, (2022) .

B6: Similitudes nucleotídicas obtenidas con secuencias del gen mitocondrial COI de los individuos positivos a fitoplasmas del subgrupo 16SrIII-J

Código insecto	Familia	Resultado BLASTn COI (especie más cercana)	% Cobertura	% Identidad
Pa (4F)	Trioziidae	<i>Trioza</i>	75	56,83
Pa(6-2)	Cicadellidae	<i>Deltocephalus gnarus</i>	94	85,62

B7: Resultado del BLASTn realizado en Genbank para las muestras con amplificaciones inespecíficas productos del análisis nested-PCR.

Código muestra	Familia	Resultado BLASTn	% Cobertura	% Identidad
LA26.11(Vrd17)	Cicadellidae	<i>Candidatus Baumannia cicadellinicola</i> cepa B-GSS	99	93,8
PA(PMB7-4)	Psyllidae	uncultured bacterium partial 16S rRNA gene	98	99,5
PA(V1-9)	Psyllidae	<i>B. safensis</i> cepa U17-1	97	98,61
PA(V1-4)	Psyllidae	<i>B.megaterium</i> LFS23 LFS2316S	98	99,47
PA(V1-5)	Psyllidae	<i>Bacillus</i> sp.	99	98,71
PA(V1-6)	Psyllidae	<i>Bacillus</i> sp.	96	99,52
PA(V1-7)	Psyllidae	<i>Bacillus</i> sp.	100	99,14
PA(V1-8)	Psyllidae	<i>Bacillus</i> sp.	99	98,83
CHAU5	Ericaceae	<i>Friedmanniella</i> sp.	97	99,78

