

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
ESCUELA DE POSTGRADO



**Caracterización de potenciales efectores fitopatogénicos del
fitoplasma del grupo 16SrXIII-F “*Strawberry phyllody
phytoplasma Chilean strain*” (StrPh-CL)**

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al Grado Académico de
Magíster en Bioquímica, área de especialización en Bioquímica Ambiental y
Memoria para optar al Título de Bioquímica

por

Dominique Jaras Sánchez

Directores de Tesis

Dra. Weier Cui

Facultad de Ciencias Agronómicas

Dr. Alan Zamorano

Facultad de Ciencias Agronómicas

&

Dr. Sergio Álvarez

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

JULIO 2024

Informe de Aprobación de Tesis de Magíster

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título “Caracterización de potenciales efectores fitopatogénicos del fitoplasma del grupo 16SrXIII-F “*Strawberry phyllody phytoplasma Chilean strain*” (StrPh-CL)” presentada por la candidata:

DOMINIQUE JARAS SÁNCHEZ

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica área de especialización en Bioquímica Ambiental y al título de Bioquímica, en el examen público rendido el día

Directores de Tesis

.....

Dra. Weier Cui

Dr. Alan Zamorano

Dr. Sergio Álvarez

Comisión Informante de Tesis

.....

Dr. Carlos Santiviago
Presidente de Comisión

Dr. Davor Cotoras

Dr. Boris Sagredo

Esta tesis se desarrolló en el Laboratorio Fitovirología del Departamento Sanidad Vegetal de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile, bajo la dirección de la Dra. Weier Cui, Dr. Alan Zamorano y Dr. Sergio Álvarez. El trabajo de tesis contó con financiamiento del proyecto FONDECYT de Iniciación en Investigación 2020 N° 11200576

Dedicada a Zoel, Ñacurutu, Baibibi, Gati, Cuy y Balibey

Agradecimientos

En primer lugar, quisiera agradecer a todo el equipo del laboratorio de Fitovirología de la Universidad de Chile por darme la oportunidad de poder trabajar en un área fascinante. Muchas gracias al Profe Alan, que con su guía, conocimiento y apoyo se ha podido desarrollar este trabajo con resultados inesperados. Creo que es un verdadero Profesor.

Quiero agradecer a la Weier, con la que aprendí sobre cómo aplicar la rigurosidad en esta área y un montón sobre la vida. Ser tutorada suya es un privilegio.

A las compañeras del proceso, con las que nos hicimos amigas en el camino. Muchas gracias a la Dani y a la Carli; con las que conversamos largas horas camino a nuestras casas y pudimos compartir nuestras penas y alegrías de lab. Nunca habría podido lograr todo lo que se logró sin su ayuda y su consejo; la confianza que tengo con ustedes es un tesoro.

A toda la Bqton, con la que compartimos y seguimos compartiendo bellos momentos juntos. Me han enseñado lo bella que es la vida con su compañía; me han salvado en momentos oscuros y hemos sido felices juntos en buenos momentos. Espero seguir compartiendo con ustedes los años venideros.

A Iván, que me ha acompañado en este proceso ofreciéndome una compañía leal, un espacio de escucha, una paciencia infinita y un amor inmenso. Con tu ayuda y tu compañía, todo es mejor.

Al millón de personas que me acompañaron en este camino y que no alcanzo a mencionar aquí. Al Tío Guillermo y la Tía Ceci que me han acogido muchos años como si fuera su hija, a la Cami H con la que conversamos mil veces de irnos al extranjero, a mis amigas Cata y Caro que son mis compañeras de vida y que adoro con el alma; a mi amigo Mattamala cuya amistad vale oro, y muchos otros compañeros de este camino que no alcanzo a escribir aquí.

A toda mi familia, que me recuerda que el amor siempre prevalece y que, de una forma u otra, me conecta con la fascinación con este planeta y sus formas de vida. Muchas gracias.

Presentaciones en Congresos Nacionales

Jaras, D., Fiore, N., Zamorano, A., Cui, W. *El nuevo efector patogénico SAP42 codificado en el genoma del fitoplasma del grupo XIII-F “Strawberry Phyllody Chile” (StrPh-CL) causa enanismo y alteraciones florales en plantas.* Diciembre 2023. Universidad de O´Higgins, Santa Cruz-Chile.

Muga, A.; **Jaras, D.**; Díaz, D.; Zamorano, A.; Fiore, N.; Quiroga, N. *Prospección de virus y viroides en huertos de cítricos en la región de O´Higgins, Chile.* Diciembre 2023. Universidad de O´Higgins, Santa Cruz-Chile.

Jaras, D., Fiore, N., Zamorano, A., Cui, W. *Identificación de genes con potencial fitopatogénico del fitoplasma 16SrXIII-F.* XXIX Congreso de la Sociedad Chilena de Fitopatología. Diciembre 2022. Universidad Técnica Federico Santa María, Valparaíso-Chile.

Índice de Contenidos

Índice de Contenidos	vii
Índice de Figuras	xi
Índice de Tablas	xiii
Resumen	xiv
Abstract	xvi
1: Introducción	1
1.1 Fitoplasmas: patógenos intracelulares de plantas e insectos	1
1.2 Ciclo infeccioso de fitoplasmas	3
1.3 Mecanismos de patogenicidad de fitoplasmas	5
1.4 SAP54 y filodia	6
1.5 SAP11, SAP05 y escoba de brujas	7
1.6 Tengu y enanismo, esterilidad y escoba de brujas	7
1.7 Epidemiología de fitoplasmas en América Latina	8
1.8 Fitoplasma del subgrupo ribosomal 16S rRNA XIII-F “ <i>Strawberry Phyl- lody Chile</i> ”	9
2: Hipótesis	12
3: Objetivo General	13
4: Objetivos Específicos	14
4.1 Objetivo Específico 1. Establecer correlación entre fenotipo de infección de <i>Arabidopsis thaliana</i> ecotipo Shahdara y la expresión diferencial de genes que codifican a potenciales efectores fitopatogénicos homólogos a Tengu y SAPs.	14

4.2	Objetivo Específico 2. Evaluar la capacidad individual de los potenciales efectores fitopatogénicos de fitoplasma del grupo 16SrXIII-F cepa StrPh-CL de inducir síntomas en plantas	14
5:	Materiales y Métodos	15
5.1	Ensayo de transmisión de StrPh-CL con insectos vectores <i>Cixiosoma</i> sp., capturados en campo a plantas modelo de <i>Arabidopsis thaliana</i> ecotipo Shahdara (<i>A. thaliana</i> Sha)	15
5.1.1	Captura de insectos vectores <i>Cixiosoma</i> sp. en huerto de cultivo de frutilla en la comuna de Litueche, VI Región	15
5.1.2	Cultivo de <i>Arabidopsis thaliana</i> ecotipo Shahdara, montaje de cámaras de transmisión e inicio de contacto con los insectos vectores <i>Cixiosoma</i> sp.	15
5.2	Diagnóstico molecular de la infección de <i>A. thaliana</i> Sha y <i>Cixiosoma</i> sp. con StrPh-CL	16
5.2.1	Recuperación de insectos de <i>Cixiosoma</i> sp. desde cámaras de transmisión	16
5.2.2	Registro de fenotipo de plantas de <i>A. thaliana</i> Sha y extracción de RNA desde material vegetal	16
5.2.3	Extracción de RNA de insectos <i>Cixiosoma</i> sp.	17
5.2.4	Síntesis de cDNA a partir de muestras de RNA de <i>A. thaliana</i> Sha y <i>Cixiosoma</i> sp.	17
5.2.5	Diagnóstico de StrPh-CL en muestras <i>A. thaliana</i> Sha y <i>Cixiosoma</i> sp. mediante amplificación del gen 16S rRNA	19
5.3	Análisis de expresión relativa de genes que codifican candidatos a efectores fitopatogénicos codificados en el genoma de StrPh-CL	20
5.3.1	Validación de partidores diseñados para qPCR de candidatos a efectores de StrPh-CL en muestras de <i>A. thaliana</i> Sha y <i>Cixiosoma</i> sp.	20
5.4	Construcción de vectores virales pBSG057 recombinantes con los genes que codifican homólogos de <i>sap54</i> y <i>tengu</i> en StrPh-CL	22
5.4.1	Amplificación de fragmentos con polimerasa de Alta Fidelidad	22
5.4.2	<i>A-tailing</i> de amplicones obtenidos	25
5.4.3	Clonamiento de los amplicones correspondientes a <i>sap54</i> , <i>tengu A</i> , <i>tengu C</i> , <i>tengu F</i> y <i>tengu G</i> en el vector pGEM®-T Easy.	25

5.4.4	Digestión de plásmidos pGEMTEasy- <i>sap54</i> , pGEMTEasy- <i>tengu A</i> , pGEMTEasy- <i>tengu C</i> , pGEMTEasy- <i>tengu F</i> , pGEMTEasy- <i>tengu G</i> y pBSG1057- <i>FRU01</i> con las enzimas de restricción <i>PacI</i> y <i>XhoI</i>	26
5.4.5	Subclonamiento de fragmentos <i>sap54</i> , <i>tengu A</i> , <i>tengu C</i> , <i>tengu F</i> y <i>tengu G</i> digeridos con <i>PacI</i> y <i>XhoI</i> al vector pBSG1057 por complementariedad de bases	26
5.5	Obtención de plantas de <i>Nicotiana benthamiana</i> infectadas con viriones recombinantes de TMV como modelo de expresión transiente de los genes que codifican candidatos a efectores patogénicos	28
5.5.1	Transcripción <i>in vitro</i> de vectores virales recombinantes pBSG1057- <i>sap54</i> , pBSG1057- <i>tengu C</i> , pBSG1057- <i>tengu F</i> y pBSG1057- <i>gfp</i>	28
5.5.2	Inoculación mecánica de genoma viral ssRNA (+) que codifica el virus recombinante de TMV en el hospedero vegetal <i>N. benthamiana</i>	28
5.5.3	Detección de genoma de virus recombinante de TMV en plantas de <i>N. benthamiana</i> infectadas	29
5.5.4	Transmisión de viriones recombinantes de TMV desde material vegetal infectado de <i>N. benthamiana</i> a plantas sanas de <i>N. benthamiana</i>	29
6:	Resultados	30
6.1	Síntomas de infección de fitoplasma StrPh-CL en <i>A. thaliana</i> ecotipo Shahdara	30
6.2	Expresión diferencial de genes que codifican candidatos a efectores fitopatogénicos de StrPh-CL en <i>A. thaliana</i> Sha v/s <i>Cixiosoma</i> sp.	37
6.3	Obtención de plantas de <i>N. benthamiana</i> infectadas con viriones recombinantes de TMV que expresan el gen <i>sap42_strphCL</i>	39
6.4	Síntomas de plantas de <i>N. benthamiana</i> infectadas con viriones recombinantes de TMV que expresan el gen <i>sap42_strphCL</i>	46
7:	Discusión	55
7.1	Síntomas de retraso en el desarrollo floral, retraso de elongación de tallo y aumento de área foliar en <i>Arabidopsis thaliana</i> ecotipo Shahdara infectadas con fitoplasma StrPh-CL	55

7.2	Selección de genes que codifican homólogos a SAP54 y Tengu de StrPh-CL para expresión heteróloga en <i>N. benthamiana</i>	57
7.3	El gen homólogo de SAP42 en StrPh-CL es un efector fitopatogénico capaz de inducir alteraciones foliares, florales, frutales y de arquitectura de la planta en <i>N. benthamiana</i>	58
8:	Conclusiones	63
9:	Bibliografía	64
Apéndice A: Secuencias nucleotídicas de clones recombinantes de <i>E. coli</i> TOP10		
	transformados	con
	pBSG1057	vectores
		78
A.1	pBSG1057-sap54	78
A.2	pBSG1057-tengu A	79
A.3	pBSG1057-tengu C	81
A.4	pBSG1057-tengu F	82
A.5	pBSG1057-tengu G	83

Índice de Figuras

Figura 1. Ciclo de vida de los fitoplasmas	4
Figura 2. Genes candidatos que codifican a homólogos de efectores patogénicos en de StrPh-CL.	10
Figura 3. <i>A. thaliana</i> Sha I-A, F-C y E-A; y los insectos E-2, F-1, I-4 e I-5 de <i>Cixiosoma</i> sp. son portadores de fitoplasma del subgrupo ribosomal 16SrXIII-F.	31
Figura 4. La planta de <i>A. thaliana</i> ecotipo Shahdara I-A presenta síntomas de infección por StrPh-CL.	32
Figura 5. La planta sintomática de <i>A. thaliana</i> Shahdara infectada con StrPh-CL presenta una mayor área foliar y una disminución de la altura a los 40 dpe.	34
Figura 6. La planta sintomática de <i>A. thaliana</i> Shahdara infectada con StrPh-CL presenta un retraso en el desarrollo de estructuras reproductivas.	36
Figura 7. Partidores validados de qPCR para genes que codifican candidatos a efectores fitopatogénicos de StrPh-CL.	38
Figura 8. La expresión de genes <i>housekeeping</i> de StrPh-CL con el kit <i>GoTaq®</i> RT-qPCR (Promega) puede evaluarse a una concentración de partidores de 225 μ M con una dilución de cDNA de hasta 1:100.	39
Figura 9. Secuenciación de plásmidos recombinantes en el vector pBSG1057	42
Figura 10. RT-PCR de diagnóstico a los 45 dpi de infección con genomas recombinantes de TMV en plantas de <i>N. benthamiana</i>	43
Figura 11. La planta FNb3 de <i>N. benthamiana</i> se encuentra infectada con un virus recombinante de TMV que expresa el gen <i>sap42_strphCL</i>	44
Figura 12. Inoculación de un virus de TMV recombinante que expresa el gen <i>sap42_strphCL</i> en plantas de <i>N. benthamiana</i>	45

Figura 13. La planta de <i>N. benthamiana</i> infectada con un virus recombinante de TMV que expresa el gen <i>sap42_strphCL</i> presenta alteraciones en el desarrollo de tejido vegetativo desde los 28 dpi.	47
Figura 14. La planta de <i>N. benthamiana</i> infectada con un virus recombinante de TMV que expresa el gen <i>sap42_strphCL</i> son más pequeñas que los controles con y sin daño mecánico hasta los 105 dpi.	48
Figura 15. La planta de <i>N. benthamiana</i> infectada con un virus recombinante de Tobacco mosaic virus (TMV) que expresa el gen <i>sap42_strphCL</i> presenta un acortamiento de los internodos.	49
Figura 16. La planta de <i>N. benthamiana</i> infectada con un virus recombinante de TMV que expresa el gen <i>sap42_strphCL</i> presenta diversas alteraciones florales.	50
Figura 17. Progresión de desarrollo de flores y frutos de <i>N. benthamiana wild type</i>	51
Figura 18. La planta de <i>N. benthamiana</i> infectada con un virus recombinante de TMV que expresa el gen <i>sap42_strphCL</i> presenta alteraciones en el desarrollo del fruto.	53
Figura 19. El fenotipo de plantas de <i>N. benthamiana</i> infectadas con un virus recombinante de TMV que expresa el gen <i>sap42_strphCL</i> es replicable.	54

Índice de Tablas

Tabla 1. Condiciones de la reacción de PCR.	18
Tabla 2. Programa de PCR estándar con Platinum™ <i>Taq</i> DNA polimerasa. . .	18
Tabla 3. Secuencia de partidores para amplificación de los genes <i>rbc</i> y <i>coi</i> . . .	18
Tabla 4. Secuencia de partidores para amplificación de gen 16S rRNA de fito- plasma.	19
Tabla 5. Secuencia de partidores para amplificación de los genes clonados en el vector pGEM®-T Easy.	20
Tabla 6. Partidores para qPCR de genes que codifican candidatos a efectores fitopatogénicos y genes <i>housekeeping</i> de StrPh-CL.	21
Tabla 7. Partidores para genes que codifican candidatos a homólogos fitopatogénicos <i>tengu</i> , <i>sap42</i> y <i>sap54</i> de StrPh-CL.	24
Tabla 8. Mezcla de <i>A-tailing</i>	25
Tabla 9. Reactivos utilizados para digestión enzimática con <i>PacI</i> y <i>XhoI</i>	26
Tabla 10. Ligación de fragmentos al vector viral pBSG1057.	27
Tabla 11. Secuencia de partidores utilizados para la detección de genes de in- terés clonados en el vector pBSG1057.	27

Resumen

Los fitoplasmas son patógenos intracelulares no cultivables capaces de colonizar células eucariontes vegetales y animales. Su transmisión es persistente y propagativa, causando síntomas en plantas como enanismo, filodia y escoba de brujas. Esto disminuye la productividad de cultivos de interés comercial a nivel global y local.

En específico, el fitoplasma “*Strawberry Phyllody Chile*” (StrPh-CL) es una bacteria que se asocia a la aparición de síntomas de filodia en cultivos de frutilla, además de afectar cultivos tanto comerciales como nativos. Pertenece al grupo ribosomal 16SrXIII, nativo de América, y corresponde al primer fitoplasma de este grupo cuyo genoma está secuenciado.

En el genoma del fitoplasma StrPh-CL se identificaron 25 genes que codifican candidatos de efectores patogénicos, entre los cuales se encuentran homólogos de TENGU y SAPs, efectores “clásicos” de virulencia en plantas. No se han realizado estudios que describan los mecanismos moleculares de virulencia de fitoplasmas del grupo 16SrXIII, por lo que se seleccionaron los genes homólogos a Tengu y SAPs de StrPh-CL para evaluar la inducción de síntomas en hospederos vegetales.

Se realizó la transmisión de StrPh-CL a la planta modelo *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) mediante insectos vectores (*Cixiosoma* sp.) obtenidos en cultivos de frutilla de la VI Región del Libertador General Bernardo O’Higgins. Los síntomas de infección de StrPh-CL observados en *A. thaliana* son disminución de la altura de la planta, aumento del área foliar, retraso del desarrollo floral y elongación de tallo. Este es el primer reporte que describe los síntomas de StrPh-CL en plantas modelo, proporcionando información valiosa para futuros estudios *in vivo* de fitoplasmas del grupo ribosomal 16SrXIII.

Para determinar la capacidad de los genes que codifican los potenciales efec-

tores de causar síntomas en plantas, se construyeron tres vectores virales recombinantes para la expresión heteróloga individual de los candidatos a efectores patogénicos en *Nicotiana benthamiana*.

Se realizó transcripción *in vitro* con el sistema mMMESSAGE mMACHINE™ T7 de los vectores virales mutantes pBSG1057-*tengu_strphCL*, pBSG1057-*sap54_strphCL*, pBSG1057-*sap42_strphCL*, y pBSG1057-*gfp*. Luego, se inocularon en plantas de *N. benthamiana* de 4 semanas de edad mediante transmisión mecánica. Para cada vector, se inocularon 8 plantas. Del total de 32 plantas inoculadas, sólo se logró la infección en un individuo con un virus recombinante que expresa *sap42_strphCL*, que presentó síntomas de enanismo, alteraciones en la morfología floral, aparición de zarcillos, hojas rugosas y ampollas foliares.

A partir de los síntomas observados, se puede concluir que SAP42 puede causar alteraciones en el crecimiento y desarrollo floral en planta, contribuyendo a la virulencia del fitoplasma actuando como efector fitopatogénico. Esto propone la existencia de una nueva familia de efectores patogénicos que podrían explicar la virulencia de fitoplasmas del grupo 16SrXIII, que sólo se encuentran en América.

Abstract

Characterization of potential phytopathogenic effectors of the phytoplasma of the 16SrXIII-F group "Strawberry phyllody phytoplasma Chilean strain" (StrPh-CL).

Phytoplasmas are unculturable intracellular pathogens capable of colonizing eukaryotic plant and animal cells. Their transmission is persistent and propagative between plants and insects; causing symptoms in plant hosts such as dwarfism, phyllody, witches' broom, and general decline of individuals, which decreases the productivity of commercially significant crops at both global and local levels. Specifically, the phytoplasma "Strawberry Phyllody Chile" (StrPh-CL) is a bacterium associated with the appearance of phyllody symptoms in strawberry crops, in addition to affecting other commercial and native plant hosts. It belongs to the 16SrXIII ribosomal group "Mexican Periwinkle Virescence Group" and is the first native phytoplasma of this group native to the Americas with a fully sequenced genome.

Phytoplasmas colonize their plant hosts by secreting pathogenic effectors through the Sec pathway. These pathogenic effectors are directly related to the pathogen's virulence, with four effector families identified so far as symptom inducers in plants. In the genome of the StrPh-CL phytoplasma, 25 candidate genes for pathogenic effectors were identified, including homologs of TENGU and SAPs, "classic" phytoplasma pathogenic effectors. To date, no studies have described the molecular mechanisms of virulence of phytoplasmas from the 16S rRNAXIII group; therefore, these StrPh-CL genes were selected to evaluate their contribution to virulence in plant hosts, providing valuable information for future *in vivo* studies of phytoplasmas from the 16S rRNAXIII ribosomal group.

Transmission of StrPh-CL to the model plant *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) was carried out using vector insects (*Cixiosoma* sp.) carrying phytoplasma ob-

tained from strawberry crops in the VI Region of Libertador General Bernardo O'Higgins. Symptoms of StrPh-CL infection observed in *A. thaliana* include reduced plant height, increased leaf area, delayed floral development, and stem elongation. This is the first report describing StrPh-CL symptoms in model plants, providing valuable information for future *in vivo* studies of phytoplasmas from the 16SrXIII ribosomal group.

To determine the individual capacity of the candidate pathogenic effectors encoded in the StrPh-CL genome to cause symptoms in plants, recombinant viral vectors from an attenuated strain of *Tobacco mosaic Virus* (pBSG1057) were constructed. The goal was to replicate the StrPh-CL infection phenotype by heterologous expression of the candidate pathogenic effectors in *Nicotiana benthamiana* (*N. benthamiana*).

In vitro transcription was performed using the mMESSAGEMACHINE™ T7 system for the mutant viral vectors pBSG1057-*tengu_strphCL*, pBSG1057-*sap54_strphCL*, pBSG1057-*sap42_strphCL*, and pBSG1057-*gfp*. These vectors were then individually inoculated into 4-week-old *N. benthamiana* plants via mechanical transmission. For each vector, 8 plants were inoculated. Out of the 32 inoculated plants, only one individual was successfully infected with pBSG1057-*sap42_strphCL*, which showed symptoms 2 weeks post-inoculation that persisted until the plant's death. Symptoms included dwarfism, alterations in floral morphology, tendril formation, rough leaves, and foliar blisters. Based on the observed symptoms, it can be concluded that SAP42 can cause alterations in plant growth and floral development, acting as a pathogenic effector.

This is the first report associating SAP42 with plant symptomatology, proposing a whole new family of phytopathogenic effectors that could explain the virulence of 16S rRNAXIII group phytoplasmas, which are found only in the Americas.

1 Introducción

1.1 Fitoplasmas: patógenos intracelulares de plantas e insectos

Los fitoplasmas son bacterias pertenecientes a la clase Mollicutes, que se caracterizan por ser patógenos intracelulares de plantas e insectos. Estos microorganismos son patógenos en más de 1000 especies de plantas en todo el mundo, entre las que se encuentran cultivos de interés comercial (Schneider et al. 2020). La infección por fitoplasma en plantas causa síntomas como clorosis (amarillamiento de las hojas), virescencia (desarrollo de flores verdes, o pérdida de la coloración normal de los pétalos), esterilidad de las flores, filodia (desdiferenciación del tejido floral hacia hojas), enanismo, escoba de brujas (proliferación de brotes auxiliares y elongación anormal de los internodos) y enrojecimiento de las hojas (Bertaccini 2022). La aparición de estos síntomas en plantas de interés comercial afecta directamente la productividad de los cultivos, debido a que las plantas pueden dejar de producir flores y por ende frutos (Maejima et al. 2015), o bien producir frutos no comestibles y no comercializables (Pérez-López et al. 2016). Por este motivo, los fitoplasmas se consideran una epidemia de interés económico-social a nivel global y se encuentran en la lista de alerta de la EPPO (Organización Europea y Mediterránea para la Protección Vegetal) (Huang et al. 2021).

Los fitoplasmas carecen de pared celular de peptidoglicano, a diferencia de sus antecesores Gram positivo (Weisburg et al. 1989). Constituyen un claro ejemplo de evolución reductiva, ya que poseen un genoma pequeño rico en AT de aproximadamente 680–900 kb (Kumari et al. 2019; Marcone et al. 2007), que ha perdido genes importantes para el metabolismo celular, como aquellos que codifican enzimas del ciclo de Krebs, de la síntesis de ácidos grasos y subunidades de la ATP sintasa (Bai et al. 2006). Además, su genoma presenta una gran inestabilidad debido a la presencia de Unidades Potencialmente Móviles (*Potential Mobile Units*, PMU) (Dickinson 2010). Se cree que la pérdida de genes relacionados al metabolismo celular y presencia de PMUs en los fitoplasmas se debe a la adaptación a ambientes ricos en nutrientes, como es el interior de las células

vegetales (Oshima et al. 2004).

Pese a los esfuerzos para aislarlos y cultivarlos (Contaldo et al. 2012; Bertaccini et al. 2013; Contaldo et al. 2016) no se ha logrado crear un sistema consistente para el cultivo axénico de fitoplasmas. Por eso, la propagación de fitoplasmas en material vegetal se realiza a través de injertos, obteniendo material vegetal infectado que se preserva mediante cultivo *in vitro* o bien, en invernadero. Considerando estas dificultades, los métodos de identificación y diagnóstico en matrices vegetales o animales se basan en PCR anidado con dos pares de primers universales: P1/P7 (Deng et al. 1991) y R16F2n/R2 (Gundersen et al. 1996), que se usan para amplificar una región del gen 16S rRNA de fitoplasmas. Luego, se realiza una digestión con 17 enzimas de restricción para obtener patrones de RFLP (*Restricted Fragment Length Polymorphisms*), los que se comparan con patrones modelo para conocer el grupo y subgrupo ribosomal al que pertenece el fitoplasma (Wei et al. 2008; Zhao et al. 2009; Gasparich et al. 2010).

Como alternativa para su identificación, se utiliza la secuenciación del amplicón obtenido con el PCR anidado para comparar la secuencia con cepas representantes de especies conocidas de fitoplasma (Bertaccini et al. 2022). Sin embargo, se sigue realizando la clasificación mediante patrones de RFLP *in silico* (Zhao et al. 2009).

Debido a las dificultades del cultivo axénico de fitoplasmas, se agrupó a estas bacterias bajo el género provisional '*Candidatus* Phytoplasma (*Ca. P.* ')'. Su clasificación filogenética consiste en grupos denotados por números romanos y de subgrupos que se denotan con letras de la A-Z. Así, se han identificado al menos 30 grupos y más de 300 subgrupos (Zhao et al. 2016; Bertaccini et al. 2018; Bertaccini et al. 2022; Pérez-López et al. 2024) que se pueden encontrar en una gran cantidad de hospederos animales y vegetales por todo el mundo.

Además de la secuenciación del gen 16S rRNA, otros marcadores de identificación de fitoplasma son el factor de elongación *tu* (Schneider et al. 1997), la subunidad de translocación *secY* (Im et al. 2010), además de un análisis multilocus que involucra hasta 107 genes diferentes (Firrao et al. 2013). Las tecnologías de *Next Generation Sequencing* han facilitado el ensamblaje de genomas (Kube et al. 2012; Tan et al. 2021; Correa-Marrero et al. 2024) y la realización de estudios transcriptómicos (Toruño et al. 2010; Oshima et al. 2011; Am et al. 2011). Sin embargo, las dificultades para el aislamiento de DNA de fitoplasma desde el hospedero vegetal y su genoma rico en AT constituyen factores por los cuales el ensamblaje de los genomas de fitoplasma todavía es un desafío técnico (Tan et al. 2021).

1.2 Ciclo infectivo de fitoplasmas

La principal forma de transmisión natural de fitoplasma es mediante insectos vectores que poseen un aparato perforador-chupador para alimentarse del floema de las plantas. Estos insectos corresponden al orden Hemiptera, que agrupa (entre otros) las familias Cicadellidae y Cixiidae, además de las superfamilias Fulgoroidea y Psylloidea (Weintraub et al. 2006). La infección por fitoplasmas es persistente y propagativa, ya que un individuo infectado (tanto plantas como insectos) puede portarlo y transmitirlo durante toda su vida, haciendo difícil el interrumpir o controlar el ciclo de infección en los cultivos (Hogenhout et al. 2008; Trivellone et al. 2021).

El ciclo de infección de fitoplasmas (**Figura 1**) comienza con un insecto vector portador de fitoplasma. El patógeno se aloja al interior de células de las glándulas salivales del insecto (Gourret et al. 1973; Koinuma et al. 2020), mezclándose con la saliva. En cuanto el insecto vector se alimenta de una planta sana, ocurre un intercambio saliva/floema que permite la transmisión del fitoplasma al floema del hospedero vegetal. Luego, el patógeno se aloja en las células del tubo criboso de la planta y se moviliza a través del floema erráticamente hacia los órganos del hospedero vegetal (Wei et al. 2004; Lee et al. 2007; Namba 2019).

El ciclo se repite cuando un insecto sano se alimenta de esta planta infectada, consumiendo floema portador de fitoplasma, el cual coloniza a nivel especie-específico células del intestino del insecto (Barbara et al. 2002; Kakizawa et al. 2004; Suzuki et al. 2006; Kakizawa et al. 2006; Galetto et al. 2011; Trivellone et al. 2019) ingresando vía endocitosis (Rashidi et al. 2015), para luego viajar por la hemolinfa hasta llegar a las glándulas salivales (Nakajima et al. 2009; Koinuma et al. 2020). Esto se conoce como un ciclo de hospedero dual, donde el fitoplasma es capaz de colonizar hospederos del reino Vegetal y Animal (Hogenhout et al. 2008).

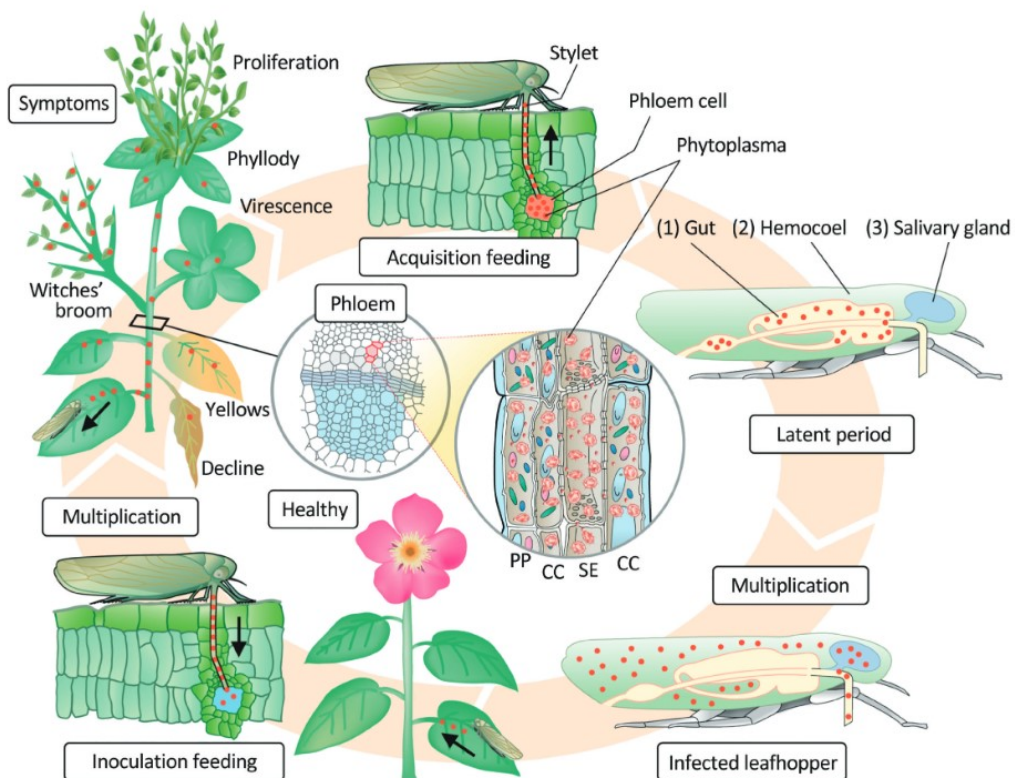


Figura 1. Ciclo de vida de los fitoplasmas. Los fitoplasmas son adquiridos por los insectos desde el floema de las plantas (a través de los estiletes) y luego ingresan al intestino del insecto (lo que se denomina adquisición por alimentación). Los fitoplasmas deben traspasar tres barreras celulares de los insectos (barreras intestinales, hemolinfa y glándulas salivales) si quieren transmitirse a las plantas. Los fitoplasmas se transmiten desde la saliva del insecto al floema (de otra planta) mediante inoculación con estilete. Luego los fitoplasmas se multiplican y establecen una infección sistémica, causando muchos síntomas únicos. PP: célula parenquimatosa del floema, CC: célula acompañante, SE: tubo criboso. Esta figura fue reproducida con modificaciones basadas en la literatura original. Namba et al. 2019

Las plantas infectadas pueden manifestar síntomas entre 7 días y 24 meses después del contacto con el insecto vector, dependiendo de la planta y del grupo de fitoplasma infectivo (Ramos et al. 2020). Los síntomas causados por la infección de fitoplasma ya mencionados provocan cambios morfológicos en plantas, exhibiendo un fenotipo de mayor crecimiento vegetativo y “rejuvenecimiento” de las plantas, que causan una mayor atracción de insectos vectores hacia plantas infectadas y consecuente oviposición en sus hojas para repetir el ciclo infeccioso del patógeno (Christensen et al. 2005; Sugio et al. 2011; MacLean et al. 2014a; Orlovskis et al. 2016; Pecher et al. 2019; Huang et al. 2020; Bertaccini 2022; Huang et al. 2022).

1.3 Mecanismos de patogenicidad de fitoplasmas

Considerando como referencia los mecanismos de infección de otros integrantes de la clase Mollicutes y organismos patogénicos Gram positivo, la investigación sobre la virulencia del fitoplasma *Aster Yellow's Witch's Broom* (AY-WB) en plantas e insectos modelo ha demostrado que utilizan el sistema de traslocasas Sec (Kakizawa et al. 2004; Oshima et al. 2011) para la secreción de efectores patogénicos denominados SAP (*Secreted Aster Yellow's Proteins*) desde el citoplasma del fitoplasma hacia el citoplasma de la célula hospedera. Los efectores canónicos de fitoplasmas se definen como proteínas de pequeño tamaño (de hasta 200 aminoácidos) que poseen un péptido señal (SP) en el extremo N-terminal de entre 20 y 50 aminoácidos, que se compone de 5 aminoácidos de carga positiva seguido de una región hidrofóbica de 7 a 15 aminoácidos y de una región sin carga de entre 3 a 7 aminoácidos polares (Bai, et al. 2009).

El avance en el estudio de marcadores moleculares de fitoplasma y las técnicas de secuenciación revolucionó el estudio de fitoplasma, pudiendo establecer nuevos parámetros de definición de especies y ensamblar cada vez más genomas completos (Tan et al. 2021; Bertaccini et al. 2022). Así, en 2022 se encontraban disponibles más de 30 genomas completos de fitoplasma (Bertaccini et al. 2022), en los que se han predicho, con diferentes técnicas bioinformáticas, proteínas efectoras hipotéticas codificadas en sus genomas (Anabestani et al. 2017; Wang et al. 2018; Cho et al. 2020; Garcion et al. 2021; Tan et al. 2021; Debonneville et al. 2022; Carreón-Anguiano et al. 2023; Gao et al. 2023).

Es importante destacar que la definición de efectores es estructural, por lo que no define a qué hospedero están dirigidos. Por eso, los estudios en efectores patogénicos de fitoplasma requieren ensayos de expresión relativa para determinar cuáles son aquellos que se expresan en planta; para luego validar su contribución a la virulencia en plantas modelo como *Arabidopsis thaliana* y *Nicotiana benthamiana*, intentando recrear los síntomas observados en campo.

Así, alrededor de 10 efectores fitopatogénicos han sido experimentalmente validados: Tengu (Hoshi et al. 2009; Sugawara et al. 2013; Minato et al. 2014), SAP54 (Am et al. 2011; MacLean et al. 2014a; Aurin et al. 2020; Iwabuchi et al. 2020), SAP11 (Bai et al. 2009; Sugio et al. 2011; Lu et al. 2014a; Lu et al. 2014b; Pecher et al. 2019; Strohmayer et al. 2021), SAP05 (Huang et al. 2021; Huang et al. 2022), zaofeng3 y 6 (Chen et al. 2022), SWP1 (Wang et al. 2018) y SWP12 (Bai et al. 2023).

Los efectores fitopatogénicos “canónicos” de fitoplasmas se agrupan en las familias/tribus de SAP54, SAP11, SAP05 y Tengu (Carreón-Anguiano et al. 2023a). Si bien estos efectores explican muchos síntomas en planta en diferentes especies de fitoplasma, aún

no se ha investigado la contribución a la virulencia de los otros 60 efectores hipotéticos (SAPs) detectados en AY-WB (Bai et al. 2009), que además presentan homólogos en diversas especies de fitoplasmas (Bertaccini et al. 2022; Carreón-Anguiano et al. 2023b).

1.4 SAP54 y filodia

El efector SAP54 (o PHY1) provoca un fenotipo de reversión floral (filodia), además de aumentar el atractivo de las plantas infectadas hacia insectos vectores, aumentando la oviposición de éstos en sus hojas (MacLean et al. 2014a). El mecanismo molecular que explicaría este fenotipo en plantas infectadas sería la interacción proteína-proteína de SAP54 con factores de transcripción con dominio MADS de tipo II (MFTs) de clase A y E (Maejima et al. 2015), que en conjunto con la proteína RAD23 (*Radiation Sensitive*), provocan la desestabilización de MFTs como SEP3 y AP1 (MacLean et al. 2014b). Las proteínas SEP3 y AP1 se han descrito como factores de diferenciación floral (Liu et al. 2009; Kaufmann et al. 2010). Estas interacciones proteína-proteína provocan una interrupción de la cascada de señalización que permite la diferenciación floral, desencadenando el fenotipo de filodia observado en plantas infectadas con fitoplasma (Maejima et al. 2014; 2015).

Por otra parte, se han descrito mutaciones puntuales en ciertos residuos aminoacídicos en diferentes homólogos de SAP54 que se relacionan con la aparición de diferentes grados de filodia en modelos vegetales (Liao et al. 2019; Iwabuchi et al. 2020). Sin embargo, la investigación sugiere que el fenotipo de filodia o de flores *leaf-like* producido por SAP54 sería un efecto secundario del efector, siendo su efecto principal en hospederos vegetales el aumento de la oviposición de insectos en las hojas de las plantas infectadas (MacLean et al. 2014a). Esta hipótesis se sustenta en que los insectos vectores oviposicionan más en plantas que presentan filodia y expresan SAP54 que en plantas que sólo presentan filodia (Orlovskis et al. 2016).

Aun así, es importante mencionar que los MFTs no sólo regulan al expresión genes relacionados con el desarrollo floral, sino que también regulan la síntesis de hormonas como jasmonatos, giberelinas y auxina (Gregis et al. 2013), por lo que la atracción de insectos causada por SAP54 se debería a alteraciones hormonales de la planta.

A nivel filogenético, los homólogos más cercanos de SAP54 se pueden encontrar en cepas de fitoplasma filogenéticamente distantes pero que poseen los mismos hospederos vegetales. Es decir, SAP54 evolucionó en forma independiente de la filogenia de los fitoplasmas, respaldando la hipótesis de la transferencia horizontal de genes entre fitoplasmas que infectan un mismo hospedero (Singh et al. 2020).

1.5 SAP11, SAP05 y escoba de brujas

El síntoma característico que provoca el efector SAP11 se conoce como “escoba de brujas”, que consiste en brotes de hojas aserradas y pequeñas que surgen desde un mismo punto en el tallo de la planta. El síntoma se origina por la unión de SAP11 con TCPs (una familia de 3 factores de transcripción exclusivos de plantas), que provoca que estos factores de transcripción se degraden vía proteosoma, disminuyendo la expresión de genes relacionados con proliferación floral (Wang et al. 2018). Además, SAP11 genera una disminución de ácido jasmónico (JA) causando una supresión de la inmunidad inducida de las plantas, lo que permite un aumento de la oviposición de insectos vectores y consecuentemente su progenie, que se alimenta de la planta infectada favoreciendo la propagación del fitoplasma (Sugio et al. 2011; Al-Subhi et al. 2021; Bertaccini 2022; Huang et al. 2022).

SAP05, por su parte, causa síntomas similares a SAP11, ya que provoca un retraso en el desarrollo general de la planta causando la aparición de pequeños brotes axilares de hojas aserradas con forma de rosetón, es decir, escoba de brujas. Al igual que SAP11, SAP05 induce la degradación de factores de transcripción de las familias SPL y GATA, involucrados con el desarrollo de plantas vasculares y el desarrollo de flores, explicando tanto la aparición de escoba de brujas como enanismo en las plantas (Huang et al. 2021; Huang et al. 2022).

1.6 Tengü y enanismo, esterilidad y escoba de brujas

Tengü provoca escoba de brujas, enanismo y esterilidad (masculina y femenina) en plantas infectadas con fitoplasma (Hoshi et al. 2009). Es una proteína altamente conservada, con un péptido señal que consta de 30 aminoácidos (Sugawara et al. 2013). Luego de su secreción vía traslocasas Sec, se encuentra en el citoplasma de la célula vegetal como un péptido de 40 aminoácidos de longitud. Se hipotetiza que una serina-proteasa es la causante del procesamiento de Tengü en la célula vegetal, cortando hasta el aminoácido 11 del péptido. Ésta es una región de la proteína altamente conservada y sustituciones en residuos específicos en ella modulan la gravedad de los síntomas asociados a Tengü en plantas (Sugawara et al. 2013).

En plantas, se ha demostrado que Tengü disminuye la expresión de los genes de respuesta a auxina ARF6 y ARF8, interrumpiendo mediante un mecanismo desconocido las rutas de síntesis de jasmonatos y auxinas (Minato et al. 2014). Así, el síntoma de enanismo causado por Tengü puede explicarse por una disminución de la síntesis de auxi-

nas, que se secretan en el meristema apical de las plantas y se transportan hacia las raíces, suprimiendo el crecimiento de brotes auxiliares y permitiendo el crecimiento apical (Morris et al. 2005). Plantas mutantes con silenciamiento de genes de respuesta a auxina (grupo al que pertenecen ARF6 Y ARF8) presentan enanismo (Timpte et al. 1994), fenotipo que se puede observar en plantas transgénicas que expresan TENGU (Hoshi et al. 2009). Estos síntomas en planta favorecerían la oviposición de los insectos vectores, ya que éstos prefieren hojas jóvenes amarillentas para esos fines (Christensen et al. 2005; Hogenhout et al. 2008).

Aun cuando la disminución de síntesis de auxina y jasmonatos explica el enanismo y la esterilidad de las flores, a la fecha aún no se esclarecen los mecanismos moleculares que permiten a Tengu interrumpir las rutas de síntesis de estas hormonas, a diferencia de otros efectores más estudiados como SAP11 y SAP54.

La mayoría de los homólogos de Tengu son activos y poseen una gran similitud entre sí, encontrándose todos en fitoplasmas del grupo 16SrI, por lo que pareciera que es un efector que se encuentra sólo en este grupo ribosomal (Wang et al. 2014). Sin embargo, en 2020, el laboratorio de fitovirología de la Universidad de Chile reportó un homólogo de Tengu en un fitoplasma del grupo 16SrXIII en plantas que no presentan síntomas de enanismo (Cui et al. 2020), lo que da nuevas luces sobre las relaciones evolutivas de este efector fitopatogénico a través de diferentes grupos de fitoplasma y su relación con la virulencia del patógeno.

1.7 Epidemiología de fitoplasmas en América Latina

En Latinoamérica, los países con mayor número de reportes de fitoplasmas en cultivos de interés comercial, como maíz, alfalfa, uva, papaya, frutilla y coco, son Cuba, Brasil, Argentina, México y Bolivia (Pérez-López et al. 2016). Los fitoplasmas en esta región parecieran tener una preferencia geográfica, de tal modo que los grupos de fitoplasmas que se encuentran en hemisferio norte son diferentes a aquellos del hemisferio sur, probablemente debido a las relaciones especie específicas que mantienen con sus insectos vectores que son nativos de ciertas zonas (Pérez-López et al. 2016), de manera tal que la distribución de cepas de fitoplasmas en ubicaciones geográficas específicas se corresponde con el nicho de los insectos vectores (Arocha et al. 2005; Gasparich 2010; Davis et al. 2012; Lee et al. 2014; Davis et al. 2016; Fernández et al. 2024).

En Chile, se han reportado fitoplasmas de diferentes grupos ribosomales en vides (Fiore et al. 2015a), cerezos (González et al. 2011), perales (Facundo et al. 2017), remolacha (Fiore et al. 2015b), frutillas (Cui et al. 2019), chaura y murta (Arismendi

et al. 2014), calafate (Madariaga et al. 2019) y cítricos (Quiroga et al. 2021), entre otros. Debido a los síntomas que provoca la enfermedad causada por fitoplasma, éstos se encuentran en la “lista de plagas” del Servicio Agrícola y Ganadero para su detección en material de propagación (SAG, 2023) evidenciando la preocupación de este organismo para preservar el patrimonio fitosanitario del país y controlar estos fitopatógenos capaces de infectar especies comerciales y nativas.

1.8 Fitoplasma del subgrupo ribosomal 16S rRNA XIII-F “*Strawberry Phyllody Chile*”

Los fitoplasmas del grupo ribosomal 16SrXIII se encuentran geográficamente en América Latina y México (Pérez-López et al. 2016), con la excepción de un reporte en Florida, EEUU (Jomantiene et al. 1998). Es un grupo de fitoplasmas de interés regional ya que reportes en México, Argentina y Brasil indican síntomas de filodia, virescencia, enrojecimiento de las hojas y clorosis en plantas de frutilla infectadas con este grupo ribosomal de fitoplasma (Fernández et al. 2015; Pérez-López et al. 2016; Melo et al. 2018). Además, es capaz de infectar otros hospederos vegetales de interés comercial (Fernández et al. 2016) y plantas reservorio como galegas (Cui et al. 2024). En específico, la pauta actualizada de clasificación de fitoplasmas indica que gran parte del grupo ribosomal 16SrXIII corresponde a la especie ‘*Ca. P. hispanicum*’ (Bertaccini et al. 2022), que se conoce como “*Mexican Periwinkle Virescence (MPV) Group*”, debido al nombre de su cepa de referencia.

Así, en Chile se ha detectado fitoplasma del subgrupo 16SrXIII-F en frutillas (Cui et al. 2019), calafate (Madariaga et al. 2019) y cítricos (Quiroga et al. 2021). Ensayos en el laboratorio de fitovirología de la Universidad de Chile comprobaron que este subgrupo de fitoplasma es el agente causal de la enfermedad “filodia de la fresa” (StrPh) en huertos de cultivo ubicados en la VI Región del Libertador Bernardo O’Higgins que presentaban casos graves de filodia e hipertrofia de aquenios (Cui et al. 2019), denominándose a esta cepa “*Strawberry phyllody phytoplasma Chilean strain*” (StrPh-CL). Se realizó la secuenciación y ensamblaje del genoma de esta cepa de fitoplasma del subgrupo 16SrXIII-F (Cui et al. 2022), quedando disponible por primera vez el ensamblaje del genoma completo de este grupo ribosomal.

El estudio epidemiológico del fitoplasma StrPh-CL en Chile ha permitido la identificación de dos insectos vectores: *Cixiosoma* sp., asociado con transmisión a frutillas y *Trioza berberidis*, asociado con transmisión a calafate (Cui et al. 2024). No se han identificado otros insectos vectores para la transmisión de fitoplasma del grupo 16SrXIII.

Además, los reportes de detección de fitoplasmas de este grupo no incluyen técnicas de PCR que amplifiquen genes que codifiquen efectores patogénicos, sino que sólo genes *housekeeping*. Por eso, se desconocen los mecanismos moleculares que explican la virulencia de fitoplasmas del grupo 16SrXIII en hospederos vegetales, a pesar de que causan enfermedades en diferentes regiones de América Latina.

El primer acercamiento a los mecanismos moleculares de virulencia de fitoplasmas del grupo 16SrXIII en plantas corresponde a un análisis *in silico* del genoma de StrPh-CL que identificó 25 genes candidatos que codificarían a efectores patogénicos (Cui et al. 2022). Entre ellos, dos se encuentran anotados como homólogos de los efectores patogénicos clásicos SAP54 y Tengu. Diez de ellos codificarían a homólogos de otras proteínas SAP descritas (Bai et al., 2009), excluyendo a los efectores clásicos SAP11 y SAP05. Por último, trece de ellos codifican proteínas sin homólogos conocidos (**Figura 2**).

CDS ID ^a	Contig no.	Length (aa)	BLASTp result and known homologs	Sequence ID
FRU_045	Contig_1	102	SVM family proteins	WP_212330693.1
FRU_059	Contig_1	271	Hypothetical proteins	WP_212330729.1
FRU_078	Contig_1	194	SAP61	WP_212330782.1
FRU_080	Contig_1	105	TENGU	WP_212330783.1
FRU_107	Contig_1	284	No homologs found	WP_212330856.1
FRU_180	Contig_2	160	SAP67	WP_212331043.1
FRU_181	Contig_2	102	SAP42	WP_212331045.1
FRU_183	Contig_2	85	No homologs found	WP_212331047.1
FRU_199	Contig_2	169	SAP42	WP_212331080.1
FRU_284	Contig_4	109	SVM family proteins	WP_212331392.1
FRU_287	Contig_4	268	Hypothetical proteins	WP_212331397.1
FRU_288	Contig_4	81	SVM family proteins	WP_212331400.1
FRU_383	Contig_6	162	SAP67	WP_212331757.1
FRU_384	Contig_6	109	SVM family proteins	WP_212331760.1
FRU_442	Contig_9	372	SAP49	WP_212331922.1
FRU_462	Contig_10	131	SVM family proteins	WP_212331973.1
FRU_467	Contig_10	191	SAP40	WP_212331981.1
FRU_506	Contig_15	261	SVM family proteins	WP_212332077.1
FRU_507	Contig_15	361	SAP49	WP_212332080.1
FRU_525	Contig_17	117	SAP54 / phyllogen	WP_212332119.1
FRU_526	Contig_17	199	Hypothetical protein	WP_225885840.1
FRU_536	Contig_18	166	SAP42	WP_212332161.1
FRU_551	Contig_20	117	SVM family proteins	WP_212332188.1
FRU_564	Contig_22	114	Hypothetical proteins	WP_212332212.1
FRU_568	Contig_23	151	SAP08	MBS2126629.1

^a CDS = protein-coding sequences.

Figura 2. Genes candidatos que codifican a homólogos de efectores patogénicos en StrPh-CL. 25 genes que codifican candidatos a efectores fueron identificados en el genoma de StrPh-CL. En la tabla se señalan código de secuencia CDS, longitud predicha de las proteínas hipotéticas (en aminoácidos) y homología con otros efectores, determinada por porcentaje de indentidad aminoacídica mayor al 45% (Cui et al. 2022).

Aun cuando se encuentran anotados genes que codifican homólogos de SAP54 y Tengu en el genoma de fitoplasma StrPh-CL, estos homólogos presentan mutaciones no sinónimas en diversas posiciones respecto a sus contrapartes en el fitoplasma AYWB y OYWB, respectivamente. En particular, el homólogo de Tengu en StrPh-CL presenta una

adición de 30 aminoácidos en su extremo C-terminal cuya función se desconoce, ya que no se había reportado una mutación semejante en otras cepas de fitoplasma estudiadas hasta la fecha (Cui et al. 2022). Además, éste corresponde al primer homólogo de Tengu descrito para un fitoplasma de grupo distinto al 16SrI (Wang et al. 2014), por lo que cabe investigar las características únicas de este efector y su efecto en la virulencia de fitoplasmas del grupo 16SrXIII.

Por otra parte, el homólogo de SAP54 en StrPh-CL presenta dos residuos aminoacídicos que se relacionan con la capacidad de inducir filodia (Iwabuchi et al. 2020); sin embargo, posee deleciones en ciertos residuos que impiden asegurar que este efector sea el causante de los síntomas causados por StrPh-CL observados en campo. Además, este homólogo posee un 95% de identidad aminoacídica con el homólogo activo que se encuentra en un fitoplasma del grupo ribosomal 16SrIII-J, identificado en diversos hospederos vegetales en Chile (Gamboa et al. 2019), por lo que falta evidencia empírica que respalde la contribución a la virulencia del homólogo de SAP54 en StrPh-CL. Es importante destacar que no se ha descartado la contribución a la virulencia del patógeno en plantas de ninguno de los demás 13 candidatos a homólogos de SAPs encontrados en el genoma de StrPh-CL.

Así, hasta la fecha se desconocen los mecanismos moleculares de virulencia de fitoplasmas del grupo 16SrXIII; sin embargo, los análisis *in silico* de StrPh-CL indican 25 genes que codifican candidatos a efectores patogénicos; de los cuales dos corresponden a homólogos de familias de efectores clásicos de fitoplasmas. Sin embargo, falta evidencia empírica que relacione a los efectores codificados en el genoma de StrPh-CL con su virulencia en plantas. Considerando los antecedentes mencionados, se plantea la siguiente hipótesis:

2 Hipótesis

Los potenciales efectores homólogos a Tengu y SAPs del fitoplasma del grupo 16SrXIII-F cepa StrPh-CL contribuyen a la virulencia del patógeno induciendo alteraciones florales en las plantas modelo *Nicotiana benthamiana* y *Arabidopsis thaliana* ecotipo Shahdara.

3 Objetivo General

Determinar capacidad fitopatogénica de los efectores homólogos del tipo SAPs y Tengu del fitoplasma 16SrXIII-F cepa StrPh-Cl en *Nicotiana benthamiana* y *Arabidopsis thaliana*.

4 Objetivos Específicos

4.1 Objetivo Específico 1. Establecer correlación entre fenotipo de infección de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Shahdara y la expresión diferencial de genes que codifican a potenciales efectores fitopatogénicos homólogos a Tengu y SAPs.

Se realizaron ensayos de transmisión del patógeno a la planta modelo *Arabidopsis thaliana* ecotipo Shahdara con insectos vectores del género *Cixiosoma* sp., capturados en campos de cultivo de frutilla en la comuna de Litueche, Región de O'Higgins. Luego, se realizó un ensayo de expresión diferencial en planta v/s insecto de genes que codifican homólogos a SAPs y Tengu. Finalmente, seleccionaron por ortología los genes que codifican a Tengu y SAP54 en StrPh-CL como candidatos para recrear la enfermedad en plantas modelo.

4.2 Objetivo Específico 2. Evaluar la capacidad individual de los potenciales efectores fitopatogénicos de fitoplasma del grupo 16SrXIII-F cepa StrPh-CL de inducir síntomas en plantas

Se generaron vectores virales recombinantes de cepas atenuadas de virus Mosaico del Tabaco (TMV) que expresan los genes *tengu_strphCL* y *sap54_strphCL*. Se inocularon mediante transmisión mecánica genomas ssRNA (+) de estos virus recombinantes en plantas de *N. benthamiana*. Se evaluó la aparición de un fenotipo de infección por fitoplasma StrPh-CL.

5 Materiales y Métodos

5.1 Ensayo de transmisión de StrPh-CL con insectos vectores *Cixiosoma* sp., capturados en campo a plantas modelo de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Shahdara (*A. thaliana* Sha)

5.1.1 Captura de insectos vectores *Cixiosoma* sp. en huerto de cultivo de frutilla en la comuna de Litueche, VI Región

Durante el mes de mayo de 2022 se realizaron salidas a terreno en un campo de cultivo de frutilla en la comuna de Litueche, VII Región del Libertador Bernardo O'Higgins. Se realizaron barridos con red entomológica tanto en el cultivo como en la vegetación espontánea que crecía entre los cultivos y alrededor del campo. Se identificaron los insectos en campo observando claves morfológicas macroscópicas visibles como tamaño, forma, color y patrones en el dorso característicos de individuos de *Cixiosoma* sp. (Cui et al. 2024). Las capturas se realizaron a mediodía en días soleados después de lluvias, cuando se puede encontrar un mayor movimiento de los insectos en la temporada de otoño. Se capturaron 60 individuos vivos de *Cixiosoma* sp. (machos o hembras), que se guardaron en tubos de ensayo con tapones de algodón y trasladaron a 4°C hacia el laboratorio de Fitovirología de la Universidad de Chile para utilizarlos en el ensayo de transmisión de fitoplasma.

5.1.2 Cultivo de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Shahdara, montaje de cámaras de transmisión e inicio de contacto con los insectos vectores *Cixiosoma* sp.

Se sembraron semillas de *A. thaliana* Sha en sustrato autoclavado en un total de 12 recipientes cuadrados plásticos de 8,5 cm x 8,5 cm x 10 cm (ancho x profundidad x alto), cada uno con un total de 4 semillas ubicadas equidistantemente en cada extremo del recipiente. Se cultivaron las semillas a 22°C con un fotoperíodo de 16 h/8 h (luz/oscuridad). Cuando las plantas cumplieron 20 días de edad fueron cubiertas con un vaso de plástico

transparente invertido de 20 cm de alto al que se le realizó una incisión circular de 2 cm de diámetro en la base. El vaso plástico modificado se ajustó al recipiente plástico con PARAFILM® M sin dejar aberturas, creando una cámara de transmisión. Se utilizó un total de 11 cámaras para la transmisión. Luego, a cada cámara de transmisión se añadieron 5 insectos vivos capturados en campo (ver 1.1), utilizando el agujero de 2 cm de diámetro para insertar un tubo de ensayo y dejar caer los insectos por gravedad y se selló el agujero con un tapón de algodón. Las plantas de *A. thaliana* Sha se expusieron un total de 10 días a los insectos vectores y luego se realizó la recuperación de los insectos. A modo de control, se montó una cámara de transmisión sin insectos. A cada una de las cámaras se le asignó una letra por orden alfabético desde la A hasta la K.

5.2 Diagnóstico molecular de la infección de *A. thaliana* Sha y *Cixiosoma* sp. con StrPh-CL

5.2.1 Recuperación de insectos de *Cixiosoma* sp. desde cámaras de transmisión

Una vez transcurridos los 10 días de exposición de las plantas a los insectos vectores, se añadió aproximadamente 1,5 mL de Acetato de Etilo 99% (Sigma Aldrich) al tapón de algodón durante 10 minutos para asfixiar a los insectos, para luego retirar el tapón y recuperar los cuerpos individualmente en tubos Eppendorf de 2 mL. Luego, se congelaron los insectos en N₂ líquido y se conservaron a -80°C.

5.2.2 Registro de fenotipo de plantas de *A. thaliana* Sha y extracción de RNA desde material vegetal

Luego de la recuperación de los insectos, las plantas se mantuvieron a 22°C, bajo un fotoperíodo de 16 h/8 h hasta 90 días post exposición (dpe). Se realizó registro fotográfico del fenotipo de las plantas cada 5 días en búsqueda de la aparición de síntomas y se cuantificó el área foliar utilizando ImageJ (Schneider et al. 2012). Se recolectó 0,05 g de tejido vegetal (hojas y tallos) en los de 15, 45, 80 y 90 dpe, a partir del cual se extrajo RNA con el kit Plant Virus RNA (Geneaid), según las instrucciones del fabricante. Se evaluó la calidad de la extracción cualitativamente por electroforesis en gel de agarosa al 1,2% en solución TAE 1X y Bromuro de Etidio (BrEt) a una concentración final de 5 mg/mL. La corrida electroforética se realizó durante 25 minutos a voltaje constante de 150V.

Se analizó la calidad de las muestras verificando por espectrofotometría (utilizando un nanofotómetro EPOCH) que la razón 260/280 se encontrara en un rango entre 1,8 a 2 y se cuantificó el RNA para posterior síntesis de cDNA.

5.2.3 Extracción de RNA de insectos *Cixiosoma* sp.

A partir del material congelado en 4.2.1 se realizó extracción de RNA con un protocolo mixto utilizando TRIzol™ (Invitrogen) y columnas de sílica del kit de extracción de RNA mirVana™ (ThermoFisher): en primer lugar, se homogenizó la muestra con un pistilo autoclavado en un tubo Eppendorf de 2 mL sumergido en N₂ líquido. Se añadieron 500 µL de TRIzol™ (Invitrogen), se homogenizó la muestra y se descongeló en hielo. Luego, se añadieron 250 µL de isopropanol 100% y se incubó 10 min a 4°C y se centrifugó por 10 min a 12.000 x g a 4°C. Se recuperó la fase acuosa, se añadieron 1,25 volúmenes de etanol 100% y se homogenizó la muestra por inversión. Se prepararon las columnas del kit mirVana™ (ThermoFisher), se añadió la mezcla de solución acuosa/etanol y se centrifugó por 15 seg a 10.000 x g. A partir de este punto, se siguió con el protocolo de lavado y elución como indican las instrucciones del fabricante de kit mirVana™. Se evaluó la calidad y cantidad de RNA en las muestras como se describe en 4.2.2.

5.2.4 Síntesis de cDNA a partir de muestras de RNA de *A. thaliana* Sha y *Cixiosoma* sp.

En primer lugar, se realizó digestión del producto obtenido en 4.2.2 y 4.2.3 con DNAsa I (libre de RNAsa) (Novagen) según instrucciones del fabricante. Luego, se utilizaron 200 ng de RNA para realizar la transcripción reversa con la enzima M-MLV transcriptasa reversa (Promega), con *random primers* según protocolo del fabricante. Con el cDNA obtenido se realizó PCR de genes *housekeeping* como control de síntesis de DNA (rubisco (*rbc*) para cDNA obtenido de plantas y citocromo oxidasa subunidad I (*coi*) (**Tabla 3**) (Folmer et al. 1994), para cDNA de insectos) con Platinum™ Taq DNA polimerasa en las condiciones que se especifican en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Condiciones de la reacción de PCR.

Reactivo	Concentración final	Volumen
H ₂ O libre de nucleasas	-	- μ L
Buffer PCR 10X -Mg	1X	3 μ L
50 mM MgCl ₂	2,5 mM	1,5 μ L
10 mM dNTP mix	0,33 mM	1 μ L
25 μ M Partidor forward	0,8 μ M	1 μ L
25 μ M Partidor reverse	0,8 μ M	1 μ L
Platinum™ Taq DNA polimerasa	4 U	0,2 μ L
DNA molde	Hasta 500 ng	Hasta 5 μ L
Volumen total	-	30 μ L

Para todas las reacciones con Platinum™ Taq DNA polimerasa se siguió el programa de amplificación estándar que se lista en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Programa de PCR estándar con Platinum™ Taq DNA polimerasa.

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Denaturación inicial	94°C	2 min	1
Denaturación	94°C	30 seg	35
Alineamiento	T°m	30 seg	
Extensión	72°C	Te	
Extensión final	72°C	5 min	1

Se definió la temperatura de alineamiento según la temperatura de *melting* (T°m) de los partidores utilizados para cada reacción y el tiempo de extensión (Te) según el tamaño del amplicón. Los partidores utilizados para los genes *rbc* y *coi* se listan en la **Tabla 3**, junto con su T°m, Te y el tamaño del amplicón esperado.

Tabla 3. Secuencia de partidores para amplificación de los genes *rbc* y *coi*.

Gen	Nombre partidores		Secuencia 5´-3´	T°m	Te	Amplicón
<i>rbc</i>	rbc-F	F	TACTTGAACGCTACTGCAG	55°C	15 seg	200 pb
	rbc-R	R	CTGCATGCATTGCACGGTG			
<i>coi</i>	LCO1490	F	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	45°C	45 seg	770 pb
	HCO2198	R	TAAACTCAGGGTGACCAAAAAATCA			

Los fragmentos amplificados por PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1,2% en solución TAE 1X y Bromuro de Etidio (BrEt) a una concentración final de

5mg/mL utilizando *buffer* de carga con azul de bromofenol. La corrida electroforética se realizó durante 25 min a voltaje constante de 150V.

5.2.5 Diagnóstico de StrPh-CL en muestras *A. thaliana* Sha y *Cixiosoma* sp. mediante amplificación del gen 16S rRNA

A partir de las muestras de cDNA de plantas e insectos obtenidas en 4.2.4 se realizó un PCR anidado del gen 16S rRNA de fitoplasma con los partidores P1 (Deng et al. 1991) / P7 (Smart et al. 1996) y R16F2n / R2 (Gundersen et al. 1996), utilizando la mezcla de reacción de la **Tabla 1** y siguiendo el programa de PCR detallado en la **Tabla 2**. Las características de los oligonucleótidos partidores se listan en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Secuencia de partidores para amplificación de gen 16S rRNA de fitoplasma.

Gen	Nombre partidores		Secuencia 5'-3'	T°m	Te	Amplicón
16S rRNA I	P1	F	AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT	53°C	90 seg	1815 pb
	P7	R	CGTCCTTCATCGGCTCTT			
16S rRNA II	R16F2n	F	GAAACGACTGCTAAGACTGG	53°C	70 seg	1200 pb
	R2	R	TGACGGGCGGTGTGTACAAACCCCG			

Los fragmentos de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa bajo las condiciones detalladas en 4.2.4. A continuación, se purificó el DNA desde gel utilizando el kit E.Z.N.A de extracción de DNA desde geles (Omega). Para el clonamiento de los fragmentos, el DNA purificado se ligó al vector pGEM®-T Easy con T4 DNA Ligasa (Promega) según instrucciones del fabricante y se transformó en *Escherichia coli* TOP10 quimiocompetentes. Para esto, se añadió toda la reacción de ligación de 10 µL a 100 µL de suspensión bacteriana, se mezcló suavemente y se incubó en hielo durante 30 minutos.

Luego, las bacterias se incubaron a 42°C durante 2 minutos, seguidos de una incubación en hielo durante 2 minutos. A la suspensión de bacterias obtenida, se le añadieron 400 µL de medio LB a temperatura ambiente para incubarlas a 37°C durante 1 h con agitación a 180 rpm.

Posteriormente, se sembró 100 µL de la suspensión de bacterias en placas de agar LB suplementadas con Kanamicina 0,05 mg/mL, Estreptomycin 0,03 mg/mL, X-gal 0,02 mg/mL e IPTG 0,1 mg/mL. Las colonias transformadas se seleccionaron mediante *blue-white screening*, se resuspendieron en 20 µL de H₂O estéril, se almacenaron a 4°C y luego se les realizó PCR de colonias siguiendo el protocolo descrito en la **Tabla 1**. Para esta reacción se utilizó 1 µL de resuspensión bacteriana como DNA molde y los partidores de *screening* SP6/T7 que se listan en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Secuencia de partidores para amplificación de los genes clonados en el vector pGEM®-T Easy.

Gen	Nombre partidores		Secuencia 5'-3'	T [°] m	Te	Amplicón
Clonado en pGEM®-T Easy	SP6	F	ATTAGGTGACACTATAGAA	50°C	70 seg	150 pb+gen
	T7	R	AATACGACTCACTATAG			

Una alícuota de los amplicones obtenidos se analizó por electroforesis en gel de agarosa como se indica en 4.2.4, para luego purificarlos con el kit E.Z.N.A de extracción de DNA desde geles (Omega). Luego, amplicones de al menos tres clones se enviaron a secuenciación por el método de Sanger a la empresa Psomagen. Se analizaron los resultados de secuenciación con BLASTn de NCBI utilizando un criterio de al menos un 95% de identidad para confirmar el diagnóstico de StrPh-CL. Se realizó un alineamiento nucleotídico de las secuencias de referencia y las secuencias obtenidas con ClustalOmega, para luego realizar un árbol filogenético con el método de Máxima Verosimilitud en el programa programa MEGA v7.0 (Tamura et al. 2021) utilizando 1000 replicados.

5.3 Análisis de expresión relativa de genes que codifican candidatos a efectores fitopatogénicos codificados en el genoma de StrPh-CL

5.3.1 Validación de partidores diseñados para qPCR de candidatos a efectores de StrPh-CL en muestras de *A. thaliana* Sha y *Cixiosoma* sp.

Con el objetivo de realizar el análisis de expresión diferencial, se diseñaron partidores en PrimerBlast para 12 de los 25 genes que codifican candidatos a efectores fitopatogénicos descritos por Cui (Cui et al. 2022), seleccionando sólo aquellos que presentan homología con efectores SAPs descritos por Bai (Bai et al. 2009), incluyendo Tengu. Además, se diseñaron partidores para de 5 genes *housekeeping* de StrPh-CL (**Tabla 6**), utilizando los mismos genes constitutivos utilizados por MacLean (MacLean et al. 2011).

Para validar estos partidores, se realizó un PCR utilizando la mezcla de la **Tabla 1** y para cada pareja de partidores se ajustó la T[°]m y Te indicadas en la **Tabla 6** al programa de PCR indicado en la **Tabla 2**. Los fragmentos se analizaron por electroforesis en gel de agarosa como se especifica en 4.2.4, se purificaron y secuenciaron como se indica en 4.2.5.

Tabla 6. Partidores para qPCR de genes que codifican candidatos a efectores fitopatogénicos y genes *housekeeping* de StrPh-CL.

Gen	Proteína homóloga		Partidores (5´-3´)	T°m	Te (seg)	Amplícón (pb)
FRU_078	SAP61	F	CACTCCCTTCAACCGAAC	51°C	10	101
		R	ATCAATATTACAGTCGTCCC			
FRU_080	TENGU	F	CTGAACAAGACGAAGATATGGA	52°C	20	221
		R	GATAATTTGGCCTCTTTGTCG			
FRU_180	SAP67 1	F	TATGCAAGCAGAATTGGCAA	52°C	15	161
		R	GATCTTGGCGAGCAATTG			
FRU_181	SAP42 1	F	GTAATGGCGATGGATAATAA	48°C	15	154
		R	GCAACAAATTTCTTTCTTCG			
FRU_199	SAP42 2	F	GTAGATATTACAGGACTCCA	49°C	18	178
		R	GATGCAACAAACAACCAC			
FRU_383	SAP67 2	F	CAAGATCAACCAGAAAGTTC	49°C	14	134
		R	CTTCTGGACAATCAAAAAGC			
FRU_442	SAP49 1	F	CTAACAGCTGAAATTTGAAGA	48°C	14	112
		R	TTCTTAATATACCATTTGCG			
FRU_467	SAP40	F	TAGTACAAGAAATGGAAACC	47°C	20	189
		R	GTGAAGAAGTATTACGAGAT			
FRU_507	SAP49 2	F	AATCCAAGACAATCAGAAG	47°C	14	137
		R	ATATACTATTTGCACCTTC			
FRU_525	SAP54	F	ATGAATAATAATGAAGCTGGCCC	53°C	24	235
		R	GTGTTTTATAGGTTTTTAGTTGTTCTTTT			
FRU_536	SAP42 3	F	ATAATCATCAAGTAATGGCG	46°C	16	162
		R	GATCAAGTTTATTACAATGC			
FRU_568	SAP08	F	TGCTGGTAAATTTTATTCAA	46°C	22	212
		R	TTCTTTCTGAAACATTAGGA			
AYWB_440	6_fosfofructoquinasa	F	CTATTAGGTTAAAAGAAGGA	46°C	20	197
		R	TTCTTTCTGAAACATTAGGA			
AYWB_254	DNA_girasa_subunidad_A	F	CTATTAGGTTAAAAGAAGGA	48°C	15	149
		R	CATAACTCCCATACTATTAC			
AYWB_064	Docking_protein_FtsY	F	TAGCTGTTTTTAATGAAGTA	45°C	15	152
		R	AATAAGGTCTTCTAGTTTTT			
AYWB_434	Piruvato_kinasa	F	CTTAATTTTGCTAATATCCC	47°C	15	120
		R	AGTTAAAGTATCTTTGGTAA			
AYWB_007	DNA_helicasa_replicativa	F	TTTATTAGGAGTATTGCTTT	46°C	18	176
		R	TTTCATTATCTAAAGTGCTA			

Una vez validados los partidores descritos en 4.3.1 se realizó un qPCR con el cDNA obtenido en 4.2.4 con tres repeticiones técnicas utilizando el kit *GoTaq*® 1-Step RT-qPCR (Promega), que utiliza el intercalante fluorescente BRYT Green®, según instrucciones del fabricante. Se analizaron los resultados con el *software* StepOne™ versión 2.3, utilizando la configuración para la realización de una curva estándar con los mismos parámetros espectrales de la sonda SYBR® Green I, como indican las instrucciones del fabricante. Por otra parte, los fragmentos obtenidos por qPCR también se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa como se especifica en 4.2.4.

5.4 Construcción de vectores virales pBSG057 recombinantes con los genes que codifican homólogos de *sap54* y *tengu* en StrPh-CL

5.4.1 Amplificación de fragmentos con polimerasa de Alta Fidelidad

El vector pBSG1057 posee sitios de restricción para clonamiento de genes de interés que se encuentran río arriba del marco de lectura de la proteína de cápside (CP) de una cepa de Virus Mosaico del Tabaco (TMV) atenuada. La transcripción del virus recombinante es dependiente de un promotor T7, cuya traducción policistrónica ocurre directamente en el citoplasma de la célula vegetal. Por esta razón, los genes que codifican efectores patogénicos en el plásmido no deben portar el péptido señal de exportación (SP), que en el caso de *tengu_strphCL* correspondería a una delección entre el nucleótido en la posición 1 a la 90 (*tengu:1_90del*). No se realizó la delección del péptido señal de *sap54_strphCL*, ya que estudios previos realizados en el laboratorio indican que la expresión heteróloga en plantas de *sap54_strphCL* sin el péptido señal no causa síntomas de filodia (Cui, 2021). Considerando este antecedente, se realizó el clonamiento de *tengu_strphCL* sin delección del SP.

Por otra parte, considerando los antecedentes del péptido de 30 aminoácidos (P) en el extremo carboxilo terminal de *tengu_strphCL* que no se encuentra en ningún homólogo conocido (Cui et al. 2022), es que realizó la delección de P que se encuentra entre los nucleótidos 214 y 318 de *tengu_strphCL*. Esta delección se realizó sin la delección del SP (*tengu:214_318del*) y en conjunto con la delección del péptido señal (*tengu:1_90del:214_-318del*). Todos los genes *wild type* y mutantes obtenidos se describen en la **Tabla 7**, en la que se señala aquellos editados en el péptido señal (SP) y en el péptido en el extremo carboxilo terminal (P).

Para cada gen se diseñó oligonucleótidos partidores con el software SnapGene (Dot-matics), añadiendo secuencias de restricción **TTAATTAA** seguida de un codón de inicio

(ATG) a los partidores forward; y un codón de término (TAA) seguido de la secuencia de restricción **CTCGAG** a los partidores reverse (**Tabla 7**, negrita y subrayado). Este diseño permitiría un corte con las enzimas de restricción *PacI* y *XhoI* río arriba y río abajo, respectivamente, de la secuencia obtenida por PCR de las variantes *wild type* y mutantes de los homólogos de *tengu* y *sap54* de StrPh-CL (**Tabla 7**).

Con los partidores diseñados se realizó PCR con la enzima de alta fidelidad DNA polimerasa Platinum™ SuperFi™ II, según instrucciones del fabricante, a una muestra de DNA de vinca infectada con fitoplasma StrPh-CL (obtenida en laboratorio y a la cual se le descartó la infección con otros patógenos). Se utilizó el protocolo de amplificación de dos pasos para todos los amplicones deseados, según indica el fabricante para oligonucleótidos partidores mayores a 30 nucleótidos de largo.

Tabla 7. Partidores para genes que codifican candidatos a homólogos fitopatogénicos *tengu*, *sap42* y *sap54* de StrPh-CL.

Gen	Tamaño gen	Código	Características	Secuencia (5'-3')	Amplificación
<i>SAP54_strphCL (wt)</i>	354 pb	<i>sap54</i>	Gen homólogo de <i>sap54</i> wild type	F ATCTTTAAATTAATAAAATAGAGAACAAAAAATAATATGATAAAAAGG R ACTCCTCGAGTTAATCATTAAAATATTTAAAAGTGTTTTATAAG	370 pb
<i>tengu_strphCL (wt)</i>	318 pb	<i>tengu A</i>	Gen homólogo de <i>tengu</i> wild type	F ACTCTTAATTAATAATGGTAAATAAATAAATCATATATCATTTTG R ACTCCTCGAGTTACTCGATAATTTGGCCCTCTTTGTCGCC	340 pb
<i>tengu: I_90del</i>	228 pb	<i>tengu C</i>	Gen homólogo de <i>tengu</i> sin péptido señal	F ACTCTTAATTAATAATGTCTGAACAAGACGAAGATATGG R ACTCCTCGAGTTACTCGATAATTTGGCCCTCTTTGTCGCC	253 pb
<i>tengu: I_90del:214_318del</i>	123 pb	<i>tengu F</i>	Gen homólogo de <i>tengu</i> sin péptido señal y sin péptido en extremo carboxilo terminal	F ACTCTTAATTAATAATGGTAAATAAATAAATCATATATCATTTTG R ACTCCTCGAGTTAATATCTTTAATTTCTTGCATGTTTTTAAC	151 pb
<i>tengu:214_318del</i>	213 pb	<i>tengu G</i>	Gen homólogo de <i>tengu</i> sin péptido en extremo carboxilo terminal	F ACTCTTAATTAATAATGGTAAATAAATAAATCATATATCATTTTG R ACTCCTCGAGTTAATATCTTTAATTTCTTGCATGTTTTTAAC	238 pb
<i>sap42_str-phCL</i>	210 pb	<i>FRU01</i>	Gen homólogo de <i>sap42</i> en StrPh-CL sin péptido señal	F CAGCTTAATTAATAATGAATAATAATTTTAAATATACAAAACGAAATAAATAC R ACCTCTCGAGTTGTAATAAATGTAATTTGTTGTTAATTAAG	230 pb

5.4.2 *A-tailing* de amplicones obtenidos

La totalidad de reacción de PCR se analizó por electroforesis en gel de agarosa como se indica en 4.2.4. Las bandas obtenidas en el tamaño esperado se purificaron según instrucciones del fabricante con el kit E.Z.N.A de extracción de DNA (Omega Bio-Tek). Se realizó protocolo de *A-tailing* al DNA purificado con Platinum™ *Taq* DNA polimerasa como indica la **Tabla 8**, incubando la reacción a 72°C durante 20 minutos.

Tabla 8. Mezcla de *A-tailing*.

Reactivos	Concentración final	Volumen
H ₂ O libre de nucleasas	-	14,38 μL
<i>Buffer</i> PCR 10X -Mg	1X	3 μL
50 mM MgCl ₂	2,5 mM	1,5 μL
1 mM dATP	0,2 mM	6 μL
Platinum™ <i>Taq</i> DNA polimerasa	4 U	0,12 μL
DNA molde	-	5 μL
Volumen total	-	30 μL

5.4.3 Clonamiento de los amplicones correspondientes a *sap54*, *tengu A*, *tengu C*, *tengu F* y *tengu G* en el vector pGEM®-T Easy.

La totalidad de reacción de *A-tailing* se analizó por electroforesis en gel de agarosa como se indica en 4.2.4. Las bandas obtenidas en el tamaño esperado se purificaron según instrucciones del fabricante con el kit E.Z.N.A de extracción de DNA (Omega Bio-Tek) para luego realizar una ligación con T4 DNA Ligasa (Promega) de los fragmentos cada uno por sí solo en el vector pGEM®-T Easy y posterior transformación por *shock* térmico en *E. coli* TOP10, según el protocolo de clonamiento detallado en 4.2.5.

Los amplicones de los fragmentos clonados obtenidos por PCR se secuenciaron por método de Sanger por la empresa Psomagen (Maryland, EE. UU.) y se analizaron con el *software* BioEdit®, SnapGene® y BLASTn. Las colonias recombinantes confirmadas por secuenciación se cultivaron en 5 mL de medio LB líquido suplementado con Ampicilina 0,05 mg/mL y Estreptomina 0,03 mg/mL, para luego conservarlas con 2 mL de medio LB con glicerol al 10% en criotubos de 2 mL a -80°C. El resto de cultivo bacteriano se utilizó para realizar una extracción de plásmidos con el kit de miniprep GenElute™ (Sigma-Aldrich) según instrucciones del fabricante.

5.4.4 Digestión de plásmidos pGEMTEasy-*sap54*, pGEMTEasy-*tengu A*, pGEMTEasy-*tengu C*, pGEMTEasy-*tengu F*, pGEMTEasy-*tengu G* y pBSG1057-*FRU01* con las enzimas de restricción *PacI* y *XhoI*

Se realizó una digestión simultánea (**Tabla 9**) con las enzimas de restricción *PacI* y *XhoI* (New England Biolabs) de los plásmidos portadores de *sap54_strphCL* y de variantes de *tengu_strphCL* obtenidos en la sección 3.3 y del plásmido pBSG1057. Ambas digestiones se realizaron a 37°C durante 90 minutos, seguidas de una etapa de inactivación de a 60°C durante 20 minutos. En este trabajo no se utilizó el vector viral original pBSG1057-GFP, si no que una versión recombinante producida en el laboratorio, que porta el gen *FRU01* de 309 pb que se clonó en el vector pBSG1057 como parte del proyecto en el que se enmarca esta investigación, utilizando los mismos sitios de restricción para *PacI* y *XhoI*.

Así, pBSG1057-*FRU01* se utilizó para la obtención del *backbone* de pBSG1057 con los extremos cohesivos esperados luego de la digestión con las enzimas de restricción.

Tabla 9. Reactivos utilizados para digestión enzimática con *PacI* y *XhoI*.

Reactivos	Concentración final	Volumen
DNA plasmidial	20 ng/ μL	-
10x rCutSmart Buffer	1X	5 μL
<i>PacI</i> (10.000 U/mL)	0,2 U/ μL	1 μL
<i>XhoI</i> (20.000 U/mL)	0,8 U/ μL	2 μL
H ₂ O libre de nucleasas	-	Hasta 50 μL
Volumen total	-	50 μL

Se analizó por electroforesis el volumen total de reacción de digestión en geles de agarosa al 0,8% en solución TAE 1X y Bromuro de Etidio 5mg/mL. La corrida electroforética se realizó durante 30 minutos a voltaje constante de 150V. Las bandas de interés obtenidas se purificaron con el kit E.Z.N.A de extracción de DNA (Omega Bio-Tek).

5.4.5 Subclonamiento de fragmentos *sap54*, *tengu A*, *tengu C*, *tengu F* y *tengu G* digeridos con *PacI* y *XhoI* al vector pBSG1057 por complementariedad de bases

Los fragmentos digeridos con *PacI* y *XhoI* obtenidos en 3.4 se ligaron al *backbone* digerido con las mismas enzimas de pBSG1057 con T4 DNA ligasa (Promega), siguiendo instrucciones del fabricante y considerando una proporción inserto:*backbone* de 3:1 ponderado en kb como se indica en la **Tabla 10**.

Tabla 10. Ligación de fragmentos al vector viral pBSG1057.

Reactivos	Concentración final	Volumen
Ligasa 2X Buffer	1X	5 μ L
pBSG1057 (100 ng/ μ L)	10 ng/ μ L	1 μ L
T4 DNA Ligasa	0,3 Weiss/ μ L	1 μ L
DNA blanco	0,4 ng/ μ L	Entre 1 y 3 μ L
H ₂ O libre de nucleasas	-	Hasta 10 μ L
Volumen total	-	10 μ L

Posteriormente, se realizó la transformación por *shock* térmico de *E. coli* TOP10 según el protocolo de clonamiento detallado en 4.2.5. Luego de la incubación de las bacterias a 37°C durante 1 h con agitación a 180 rpm, se sembró 100 μ L de la suspensión de bacterias en placas de medio selectivo agar LB suplementado con Ampicilina 0,05 mg/mL y Estreptomycinina 0,03 mg/mL y se dejó crecer toda la noche a 37°C. Las colonias que crecieron en las placas se resuspendieron en 20 μ L de H₂O estéril y se les realizó PCR de colonias con los partidores que se detallan en la **Tabla 11**, correspondientes a partidores de *screening* que se diseñaron adyacentes al sitio de clonamiento del vector.

Tabla 11. Secuencia de partidores utilizados para la detección de genes de interés clonados en el vector pBSG1057.

Gen	Nombre partidores		Secuencia 5'-3'	T ^m	Te	Amplicón
Clonado en pBSG1057	TMVinsertoF	F	GATGATGATTCGGAGGCTACTGTGC	58°C	15 seg	150 pb+ tamaño gen
	TMVinsertoR	R	TTATGCATCTTGACTACCCCTCGA			

Los amplicones obtenidos se secuenciaron por método de Sanger por la empresa Pso-magen y se analizaron con el *software* BioEdit® y SnapGene®. Las colonias con los plásmidos recombinantes confirmados por secuenciación se recuperaron, se almacenaron a -80°C y se les extrajo el plásmido pBSG1057 recombinante con el gen de interés siguiendo la metodología que se indica en 3.3.

5.5 Obtención de plantas de *Nicotiana benthamiana* infectadas con viriones recombinantes de TMV como modelo de expresión transiente de los genes que codifican candidatos a efectores patogénicos

5.5.1 Transcripción *in vitro* de vectores virales recombinantes pBSG1057-*sap54*, pBSG1057-*tengu C*, pBSG1057-*tengu F* y pBSG1057-*gfp*

Los vectores virales pBSG1057 recombinantes obtenidos en 3.5 y el vector viral pBSG1057-*gfp* se linealizaron realizando la digestión de 2 μg del vector viral purificado con la enzima de restricción *KpnI* (New England Biolabs), según instrucciones del fabricante. Se analizó el resultado de la digestión mediante electroforesis en gel de agarosa y se purificaron las bandas con el plásmido linealizado como se describe en 3.4. Posteriormente, se realizó transcripción *in vitro* de 1 μg de plásmido linealizado con el kit mMMESSAGE mMACHINE™ T7 (ThermoFisher), según instrucciones del fabricante. La totalidad de la reacción de transcripción *in vitro* que contiene ssRNA (+) del virus recombinante se utilizó para el protocolo de transmisión mecánica en plantas de *N. benthamiana*.

5.5.2 Inoculación mecánica de genoma viral ssRNA (+) que codifica el virus recombinante de TMV en el hospedero vegetal *N. benthamiana*.

Cada genoma viral recombinante obtenido en 4.5.1 se inoculó individualmente a entre 8 a 10 plantas de *N. benthamiana*, mediante un método de inoculación mecánica modificado desde Dubes (1972) como sigue: 40 μL de reacción de transcripción con RNA infectivo se incubó con una solución de bentonita 2 mg/mL en *Buffer A* (NaCl 137 mM, KCl 2,68 mM, Na₂HPO₄ 8,15 mM y KH₂PO₄ 1,46 mM) durante 1 h a 0°C. Luego del período de incubación, se realizaron microheridas con SiO₂ (tierra de diatomeas) 95% autoclavado en las primeras hojas verdaderas de plantas de *N. benthamiana* de 6 semanas de edad. A las hojas con microheridas se les aplicó la solución con RNA infectivo, con el objetivo de que el RNA ingrese a las células vegetales a través de las microheridas y comience un ciclo replicativo. El protocolo de transmisión mecánica se repitió en las mismas plantas a las 8 semanas de edad (14 días post inoculación (dpi)) en el segundo nodo de hojas verdaderas.

Paralelamente, se realizó el mismo protocolo de inoculación mecánica con una solución idéntica a la mencionada sin RNA infectivo en 4 plantas a modo de control mecánico y 3 plantas sin heridas se utilizaron como control sin daño mecánico.

5.5.3 Detección de genoma de virus recombinante de TMV en plantas de *N. benthamiana* infectadas

La detección de partículas virales recombinantes a los 45 dpi en plantas se realizó extrayendo 0,1 g de trozos de hojas al azar desde el cuarto nodo hacia arriba de la planta, dado que TMV se mueve estocásticamente dentro de los hospederos vegetales. Para realizar el diagnóstico, se extrajo RNA del material vegetal con el kit Plant Virus RNA (Geneaid) según instrucciones del fabricante. Luego se realizó síntesis de cDNA como se indica en la sección 4.2.4, para luego realizar un diagnóstico mediante PCR (**Tabla 1**), utilizando los partidores que se señalan en la **Tabla 11**, que se analizó por electroforesis en gel de agarosa como se describe en 4.2.4. Finalmente, los fragmentos obtenidos del PCR de diagnóstico de virus recombinante se clonaron, secuenciaron y analizaron como se indica en 4.2.5 para confirmar la presencia del genoma del virus recombinante en plantas.

5.5.4 Transmisión de viriones recombinantes de TMV desde material vegetal infectado de *N. benthamiana* a plantas sanas de *N. benthamiana*

Se extrajo 0,1 g de hojas de *N. benthamiana* infectadas con viriones recombinantes de TMV detectadas en 5.5.3. El material vegetal se homogenizó en 1mL de *Buffer A* (descrito en 5.5.2) para luego inocular 10 μ L en dos hojas verdaderas del segundo nodo de plantas sanas de *N. benthamiana* de tres semanas de edad. La solución de *Buffer A* con material vegetal homogenizado sobrante se congeló a -80°C para futuras inoculaciones. Tanto a las plantas inoculadas como los controles sin inoculación se les realizó un PCR de diagnóstico del virus recombinante como se indica en 5.5.3.

6 Resultados

6.1 Síntomas de infección de fitoplasma StrPh-CL en *A. thaliana* ecotipo Shahdara

Según estudios realizados por Cui et al. 2024, se ha demostrado que el fitoplasma StrPh CL puede transmitirse a las plantas modelo de *Catharanthus roseus* (vinca) utilizando los insectos vectores *Cixiosoma* sp. Esta infección causa síntomas de filodia, virescencia y arrosetamiento, lo que se condice con la enfermedad de la filodia de la frutilla observada en campo (Cui et al. 2019). En este trabajo, se utilizaron estos insectos vectores capturados en campo para realizar un ensayo de transmisión de StrPh-CL a la planta modelo *A. thaliana* Sha. Este ecotipo es susceptible al virus del Mosaico del Tabaco (Golem et al. 2003), lo que lo hace un buen modelo de estudio para restitución de la sintomatología de la infección de StrPh-CL, mediante la expresión heteróloga de candidatos a efectores fitopatogénicos usando este virus como vector.

A partir del ensayo de transmisión se obtuvieron 3 plantas de *A. thaliana* Sha infectadas con fitoplasma (6,8% del universo de plantas expuestas al insecto), designadas con los códigos F-C, I-A y E-A. El genoma del fitoplasma StrPh-CL fue detectado con éxito mediante PCR y secuenciación de gen 16S rRNA en sólo una ocasión en cada planta: en F-C a los 15 dpe; I-A a los 45 dpe y E-A a los 70 dpe. Las secuencias obtenidas desde las muestras vegetales se agruparon con un bootstrap de 100 dentro del grupo de '*Candidatus* Phytoplasma hispanicum', específicamente dentro del subgrupo 16SrXIII-F (Figura 3), confirmándose el diagnóstico de StrPh-CL.

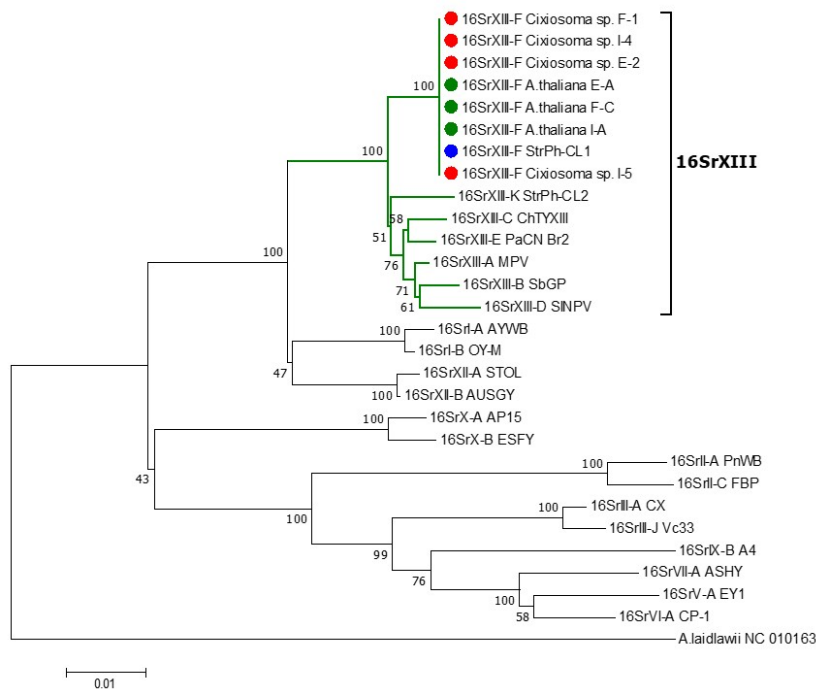


Figura 3. *A. thaliana* Sha I-A, F-C y E-A; y los insectos E-2, F-1, I-4 e I-5 de *Cixiosoma* sp. son portadores de fitoplasma del subgrupo ribosomal 16SrXIII-F. Comparación filogenética entre diferentes especies de fitoplasmas y las muestras de *A. thaliana* y *Cixiosoma* sp. El árbol filogenético se realizó con el método de Máxima Parsimonia utilizando el gen 16S rRNA. Se utilizó ClustalW para el alineamiento y se analizó con la opción de delección completa. Se utilizó *Acholeplasma laidlawii* cepa NC 0101163 como raíz del árbol. Los números en los nodos representan el porcentaje de *bootstrap* obtenidas para 1000 replicados. Se puede observar como las muestras de plantas I-A, F-C y E-A (Puntos verdes) y de insectos E-2, F-1, I-4 e I-5 (Puntos rojos) se encuentran dentro del grupo de 'Candidatus Phytoplasma hispanicum', específicamente dentro del subgrupo 16SrXIII-F representado por la cepa StrPh-CL (Punto azul), con código de acceso GenBank JAGVRH000000000.

Las plantas F-C y E-A presentaron un desarrollo morfológico normal de hojas, tallos, flores y frutos hasta los 70 dpe (**Figura 4C** y **D**), a diferencia de la planta I-A en la que se observó sintomatología de infección por fitoplasma: aumento del desarrollo foliar y falta de elongación de tallo hasta los 40 dpe (**Figura 4E**, **5C**), respecto a los controles con y sin insectos (**Figura 4A** y **B**). Los controles con y sin insecto presentaron tiempos de desarrollo de estructuras vegetativas semejantes, a diferencia de los controles con exposición a insecto presentaron amarillamiento en las hojas entre los 7 y 11 dpe, que podría deberse a estrés biótico (**Figura 4B**). Sin embargo, se pudo observar una reversión del amarillamiento de las hojas del control con exposición a insecto a los 25 dpe (**Figura 4B**), indicando que el fenotipo de los controles con exposición a insecto se normaliza asemejándose a los controles sin exposición a insecto a medida que pasa el tiempo hasta

llegar a los 40 dpe.

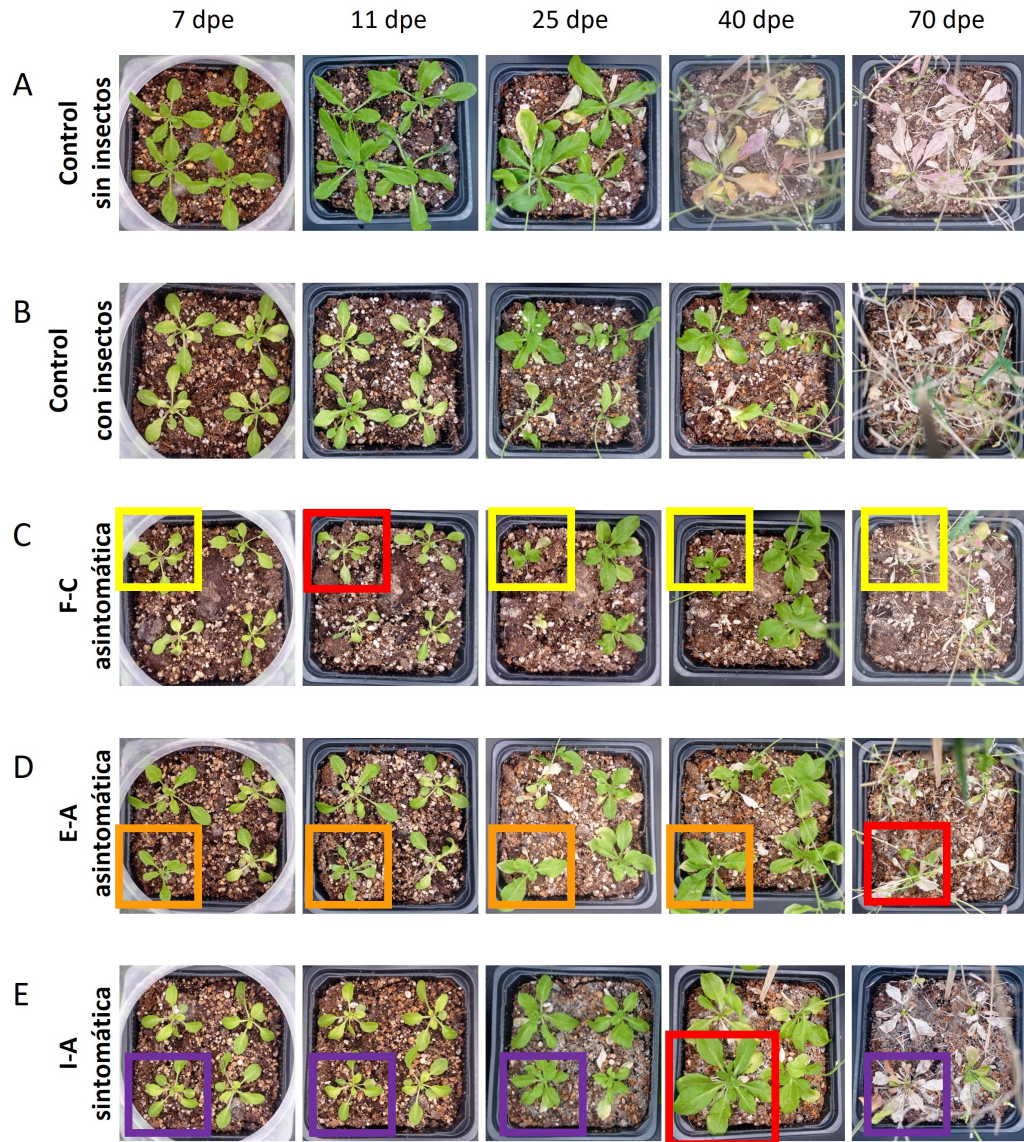


Figura 4. La planta de *A. thaliana* ecotipo Shahdara I-A presenta síntomas de infección por StrPh-CL. A. Desarrollo de plantas de *A. thaliana* sin insectos desde los 7 dpe hasta los 70 dpe B. Control de *A. thaliana* expuestas a insectos sin fitoplasma (n plantas=42), cámara de transmisión D C. En amarillo se destaca *A. thaliana* F-C asintomática; en rojo se destaca el día de diagnóstico con StrPh-CL (11 dpe) D. En naranja se destaca *A. thaliana* E-A asintomática; en rojo se destaca el día de diagnóstico con StrPh-CL (70 dpe). E. En morado se destaca *A. thaliana* I-A sintomática; en rojo se destaca el día de diagnóstico con StrPh-CL (40 dpe). Se puede observar un aumento del área foliar a los 40 dpe.

El fenotipo de la planta I-A infectada con StrPh-CL difiere de los controles a los 40 dpe, ya que se observó el doble del área foliar promedio de los controles con o sin insecto (**Figura 5A**). Al mismo tiempo, se observó una disminución de la altura producto de la inhibición de la elongación del tallo respecto a los controles y las plantas asintomáticas, presentando una altura 5 veces menor (**Figura 5B y C**). Por su parte, a los 40 dpe ambos grupos control poseen promedios de área foliar (**Figura 6A**) y altura (**Figura 6B**) similares, reforzando la idea de que los controles con exposición a insecto se recuperan del estrés biótico a medida que pasa el tiempo.

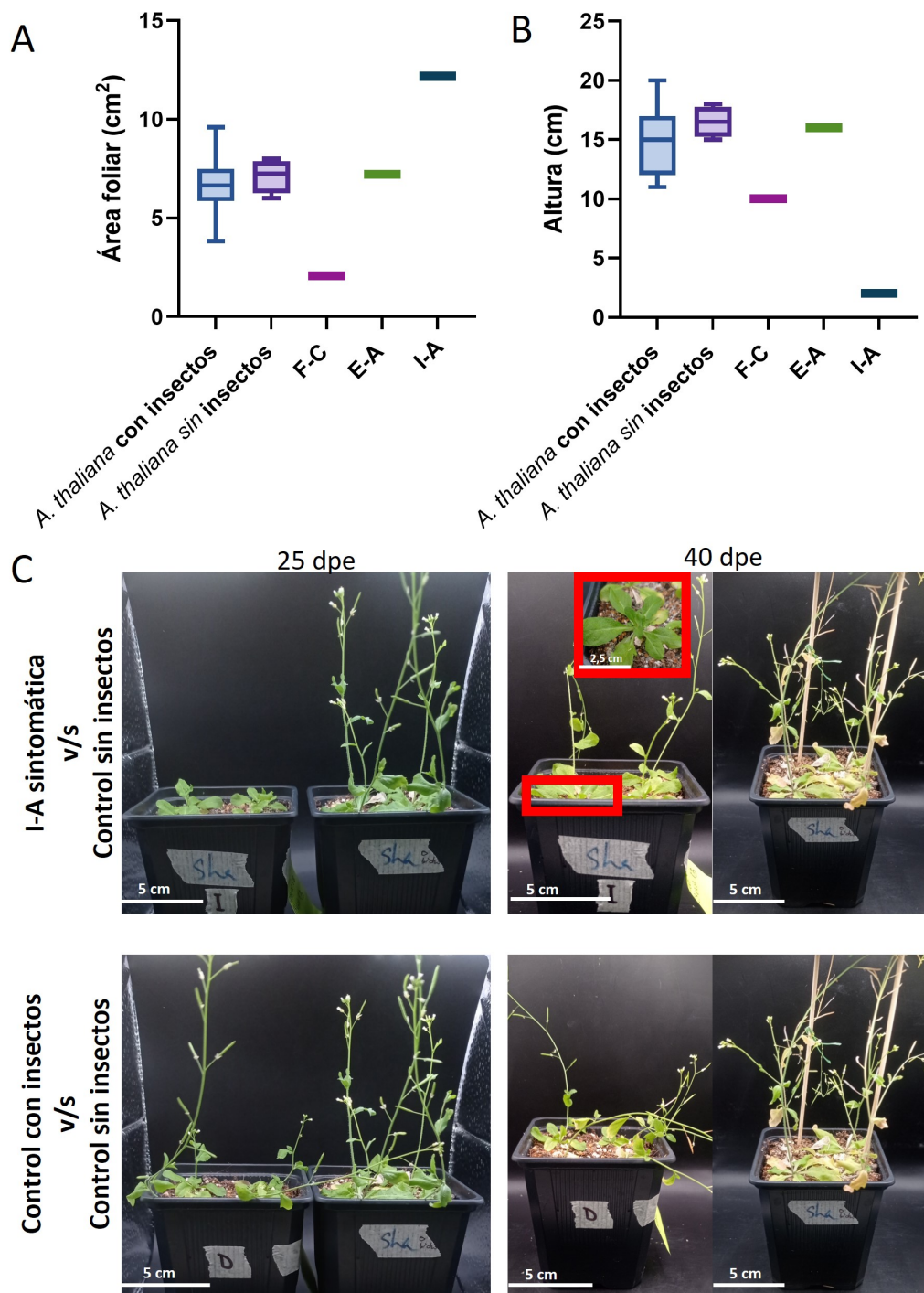


Figura 5. La planta sintomática de *A. thaliana* Shahdara infectada con StrPh-CI presenta una mayor área foliar y una disminución de la altura a los 40 dpe. A. Se muestran los valores de área foliar a los 40 dpe cuantificados con ImageJ de los controles con insectos (n=42) y sin insectos (n=4), la plantas asintomáticas F-C y E-A y la planta sintomática I-A. Se observa que la planta sintomática I-A presenta aproximadamente el doble de área foliar que los controles con insectos B. Se muestran los valores de altura a los 40 dpe cuantificados con ImageJ de los controles con y sin insectos, la plantas asintomáticas F-C y E-A y la planta sintomática I-A. Se observa que la planta sintomática I-A presenta aproximadamente cinco veces menos altura que los controles con y sin insectos C. Fotografías a los 25 y 40 dpe de la planta sintomática I-A. Se observa un retraso en la elongación de tallo a los 40 dpe.

Paralelamente, a los 25 dpe se pudo observó un nulo desarrollo floral de la planta I-A infectada con StrPh-CL; mientras que los controles ya presentaban desarrollo floral (**Figura 6A, B y C**). A los 40 dpe, la planta sintomática presenta la aparición de botones florales, aún sin elongación de tallo (**Figura 6A**). Sin embargo, luego de los 40 dpe desarrolló flores con normalidad, pero con 25 días de retraso respecto a las plantas control con y sin insectos (**Figura 6A, B y C**). Por su parte, las flores presentaron un fenotipo sin alteraciones, sin anormalidades en el desarrollo de silicuas y semillas a los 70 y 90 dpe (**Figura 6A**). Considerando los antecedentes descritos, es posible afirmar que la planta I-A de *A. thaliana* Sha a los 40 dpe a StrPh-CL presenta una disminución de la altura y un aumento del área foliar, además de un retraso del desarrollo floral y elongación de tallo. Esto indica que la planta I-A infectada con StrPh-CL retrasó su crecimiento reproductivo o alargó su fase vegetativa adulta durante 25 días.

A partir de los 40 dpe en adelante las plantas control sin exposición a insecto comenzaron la senescencia, la cual en las plantas con exposición a insecto se inició a los 50 dpe (**Figura 4A y B**). Se observó el término del ciclo de vida a los 70 dpe de todas las plantas control, mientras que la planta infectada I-A vivió hasta los 90 dpe. Esto implica que la planta infectada tuvo una sobrevida de 20 días respecto a los controles y tuvo un fenotipo juvenil durante 25 días más.

Paralelamente, se diagnosticó un total de 4 insectos portadores de fitoplasma StrPh-CL utilizados en el ensayo de transmisión designados con los códigos E-2, F-1, I-4 e I-5 (**Figura 3**). Los insectos E-2 y F-1 se encontraban en contacto con las plantas E-A y F-C respectivamente, mientras que los insectos I-4 e I-5 se encontraban en contacto con la planta I-A. No se detectó fitoplasma en los 51 insectos restantes utilizados en el ensayo, lo que explica la ausencia de plantas infectadas en las 8 cámaras de transmisión en las que se encontraban. Así, se consideraron estas plantas como controles negativos de plantas expuestas a insecto sin StrPh-CL, descartando que los síntomas observados en la planta I-A se deban a estrés biótico.

En síntesis, a partir del ensayo de transmisión se obtuvo una planta de *A. thaliana* Sha infectada con el fitoplasma StrPh-CL, siendo la primera vez que se pueden caracterizar los síntomas causados por StrPh-CL en plantas modelo. Contar con esta información es vital para ser capaces de restituir síntomas a través de la expresión heteróloga de efectores en escala de laboratorio, ya que la sintomatología asociada al patógeno depende también del hospedero, tal como se puede observar entre la planta I-A obtenida en este estudio y la sintomatología observada en frutillas de campo.



Figura 6. La planta sintomática de *A. thaliana* infectada con StrPh-CL presenta un retraso en el desarrollo de estructuras reproductivas. Comparación de fenotipo de estructuras reproductivas de plantas de *A. thaliana* infectada con StrPh-CL v/s controles con y sin exposición a insecto **A.** Fotografías 40x de estructuras reproductivas de planta sintomática I-A de los 15 a los 90 días. Se observa el nulo desarrollo floral hasta los 25 dpe, hasta que a los 40 dpe se observa la aparición de los primeros botones florales sin elongación de tallo. Luego se observa un desarrollo típico de flores y silículas hasta los 90 dpe, luego se observa un fenotipo de senescencia **B.** Fotografías 40x de estructuras reproductivas de plantas control sin insectos. Se observa el desarrollo de flores y semillas con normalidad desde los 15 dpe **C.** Fotografías 40x de estructuras reproductivas de plantas con exposición a insectos no portadores StrPh-CL. Se observa el desarrollo de flores y semillas con normalidad desde los 15 dpe, observándose un fenotipo similar a los controles sin insectos.

6.2 Expresión diferencial de genes que codifican candidatos a efectores fitopatogénicos de StrPh-CL en *A. thaliana* Sha v/s *Cixiosoma* sp.

Se realizó un ensayo de expresión diferencial mediante qPCR para luego obtener la expresión relativa de cada gen utilizando el método $\Delta\Delta\text{ct}$, que estandariza la expresión relativa con la expresión de genes *housekeeping*. El criterio de validación de partidores de genes que codifican candidatos a efectores fitopatogénicos de StrPh-CL se basó en lo siguiente: 1) la pareja de partidores debía amplificar en la muestra de DNA de vinca infectada con StrPh-CL; 2) la pareja de partidores no debía amplificar la muestra de DNA de vinca sin infectar; y 3) la pareja de partidores no debía amplificar en las muestras de cDNA de *A. thaliana* Sha sanas y cDNA de *Cixiosma* sp. sanos. Además, se utilizó la muestra de Vinca infectada con fitoplasma del subgrupo ribosomal 16S rRNA III-J (Gamboa et al. 2019) para evaluar la especificidad de los partidores entre grupos de fitoplasmas, ya que presentan algunos efectores homólogos en común son StrPh-CL. Sin embargo, esto no constituyó un criterio para el descarte de partidores. Bajo estos criterios, se validaron 8 pares de partidores de genes que codifican candidatos a efectores fitopatogénicos y 2 genes *housekeeping* de StrPh-CL que se listan en la **Figura 7**.

Gen (CDS)	Homología
Candidatos a efectores fitopatogénicos StrPh-CL	
FRU_078	SAP61
FRU_080	TENGU
FRU_180	SAP67 1
FRU_181	SAP42 1
FRU_467	SAP40
FRU_525	SAP54
FRU_536	SAP42 3
FRU_568	SAP08
Genes housekeeping StrPh-CL	
6_fosfofructoquinasa	AYWB_440
DNA_girasa_subunidad_A	AYWB_254

Figura 7. Partidores validados de qPCR para genes que codifican candidatos a efectores fitopatogénicos de StrPh-CL. Los partidores para cada uno de los genes se encuentran listados en la **Tabla 6** de la sección Metodología. Los fragmentos amplificados de los genes que codifican candidatos se comprobaron mediante secuenciación, analizándolos con el software BioEdit. Se validaron 8 de 12 pares de partidores de genes que codifican candidatos a efectores fitopatogénicos de StrPh-CL; y 2 pares de partidores de 5 pares diseñados para genes *housekeeping*. Como muestras para la validación se utilizaron muestras de DNA de vinca sin fitoplasma, vinca con fitoplasma del subgrupo ribosomal III-J, cDNA de *A. thaliana* sin fitoplasma y cDNA de *Cixiosoma* sp. sin fitoplasma. Como control positivo se utilizó DNA extraído de una vinca infectada con StrPh-CL.

Para determinar las condiciones óptimas de concentración de partidores y de cDNA inicial, se realizó qPCR con muestras de cDNA de vinca infectada con StrPh-CL y cDNA de insectos infectados con los partidores de genes *housekeeping* de StrPh-CL. Sin embargo, no se obtuvieron señales del intercalante fluorescente BRYT Green®, aunque sí se obtuvieron señales de la sonda pasiva, que correspondía al fluoróforo ROX. Los resultados de qPCR, por lo tanto, se visualizaron por electroforesis como se indica en la sección 2.2 de Metodología, observándose bandas de productos de PCR del tamaño esperado (entre 100 y 210 pb) para los partidores validados de genes *housekeeping* (**Figura 8**). Debido a estos problemas técnicos, no fue posible determinar la expresión relativa en planta v/s insecto de los candidatos a efectores fitopatogénicos.

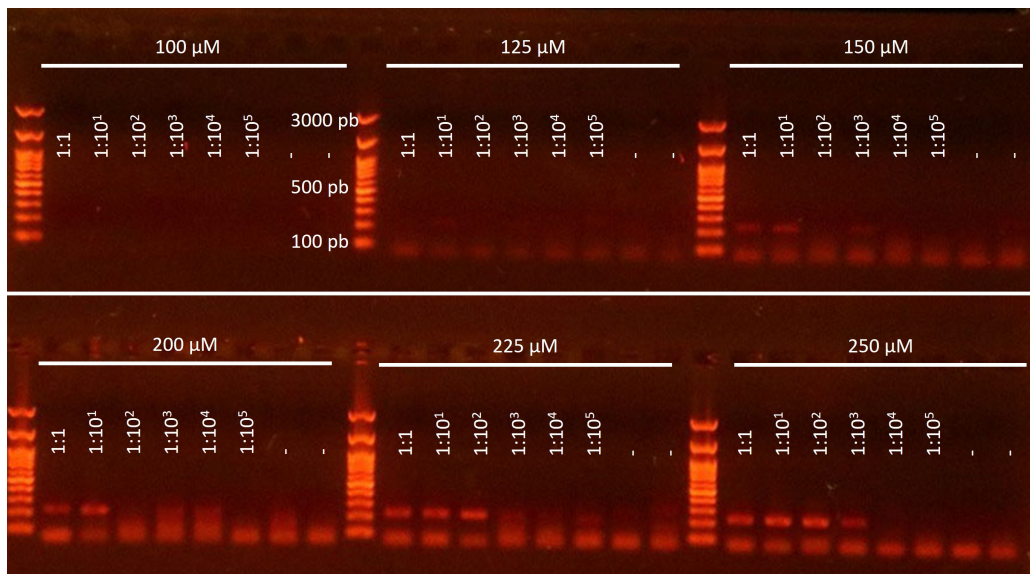


Figura 8. La expresión de genes *housekeeping* de StrPh-CL con el kit *GoTaq®* RT-qPCR (Promega) puede evaluarse a una concentración de partidores de 225 μ M con una dilución de cDNA de hasta 1:100. Electroforesis en gel de agarosa al 1,2% de los amplicones obtenidos de qPCR realizado con el kit *GoTaq®* 1-Step RT-qPCR con partidores que amplifican un fragmento del gen 6_fosfofructoquinasa de StrPh-CL. En la parte superior de cada carril se señala la concentración de partidores utilizada y la dilución de la muestra de cDNA de vinca infectada con StrPh-CL.

6.3 Obtención de plantas de *N. benthamiana* infectadas con viriones recombinantes de TMV que expresan el gen *sap42_strphCL*

Considerando los problemas técnicos para obtener los ensayos de expresión diferencial y así seleccionar aquellos genes que codifican candidatos a efectores fitopatogénicos según su sobreexpresión en planta v/s insecto, se seleccionaron para la expresión heteróloga en plantas de *N. benthamiana* los genes homólogos de SAP54 y TENGU de StrPh-CL debido a los antecedentes en literatura que respaldan la contribución a la virulencia de estos genes en hospederos vegetales (Hoshi et al. 2009; MacLean et al. 2011; Sugawara et al. 2013; Minato et al. 2014; Iwabuchi et al. 2020). ; a diferencia del resto de los 6 SAPs con partidores para qPCR validados (**Figura 7**) de los cuales no se ha demostrado su contribución a la virulencia en plantas o insectos.

Es importante señalar que el homólogo de SAP54 en StrPh-CL presenta un 95% de identidad aminoacídica con la proteína homóloga a SAP54 presente en un fitoplasma del subgrupo 16SrIII-J detectado en Chile, que sí causa arrosamiento en plantas (Gamboa et al. 2019), por lo que es posible que el síntoma severo de filodia en frutillas causado por la infección de StrPh-CL se deba a la expresión del homólogo de SAP54 en plantas.

Por otra parte, se ha demostrado que Tengu contribuye a la virulencia del patógeno en plantas; sin embargo, nunca se ha estudiado la capacidad de inducir síntomas en un fitoplasma distinto al grupo ribosomal 16SrI (Hoshi et al. 2009; Wang et al. 2014). Además, es posible que la filodia observada en campo se deba a una alteración floral en su extremo causada por cambios en la vía de señalización de JA y auxinas, vías hormonales que interrumpe Tengu en otros modelos vegetales causando esterilidad de flores (Minato et al. 2014). La secuencia aminoacídica de *tengu_strphCL* presenta 9 de los 11 aminoácidos requeridos para la inducción de síntomas en plantas, siendo los dos aminoácidos restantes de la misma naturaleza química que los del homólogo activo (Sugawara et al. 2013).

Paralelamente, se desconoce la función del péptido de 30 aminoácidos en el extremo carboxilo terminal que se ha reportado exclusivamente en el homólogo de Tengu codificado en el genoma de StrPh-CL (Cui et al. 2022), por lo que el estudio de la contribución a la virulencia de Tengu en StrPh-CL daría nuevas luces en la investigación de este efector. Dados los antecedentes bibliográficos y los problemas técnicos para obtener resultados de expresión relativa de candidatos a efectores fitopatogénicos, es que se seleccionaron los homólogos de Tengu y SAP54 codificados en StrPh-CL para su expresión heteróloga en plantas y evaluación de contribución a la virulencia.

De esta manera, se construyeron plásmidos recombinantes en el vector viral pBSG1057 con los genes *sap54_strphCL* y *tengu_strphCL*. Es importante considerar que las investigaciones realizadas en Tengu (Hoshi et al. 2009; Sugawara et al. 2013; Minato et al. 2014) y en los demás efectores descritos (Bai et al. 2009; MacLean et al. 2011; Huang et al. 2021) han determinado la contribución del efector a la virulencia expresándolo heterológamente en planta sin el péptido señal (SP).

Por ese motivo, además de construir un plásmido recombinante con *tengu_strphCL* wild type, se construyó un plásmido con una variante mutante *tengu_strphCL* con una delección del SP (*tengu:1_90del*), y otra con una delección en el SP y el péptido de 30 aminoácidos en el extremo carboxilo terminal (*tengu:1_90del:214_318del*), de modo de poder determinar la contribución este péptido (P) a la virulencia del patógeno.

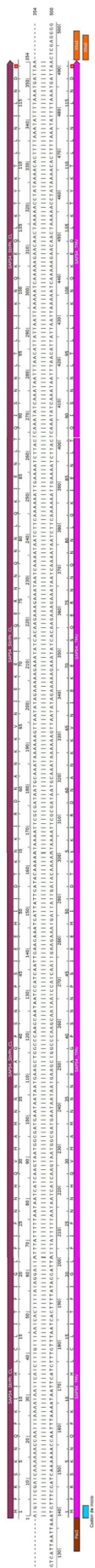
Paralelamente, se determinó que la expresión heteróloga del gen *sap54_strphCL* se realizaría con el SP, ya que trabajos preliminares realizados en el laboratorio indican que el gen *sap54_strphCL* sin SP no causaría síntomas en plantas (Cui 2021), por lo que en este trabajo se construyó y se inoculó sólo la variante *wild type* de *sap54_strphCL*.

En síntesis, se construyeron 5 vectores virales recombinantes (Tabla 8): pBSG1057-*sap54_strphCL* (*wt*), pBSG1057-*tengu_strphCL* (*tengu A*), pBSG1057-*tengu:1_90del* (*tengu C*), pBSG1057-*tengu:1_90del:214_318del* (*tengu F*) y pBSG1057-*tengu:214_318del* (*tengu G*), confirmados mediante secuenciación (**Figura 9**).

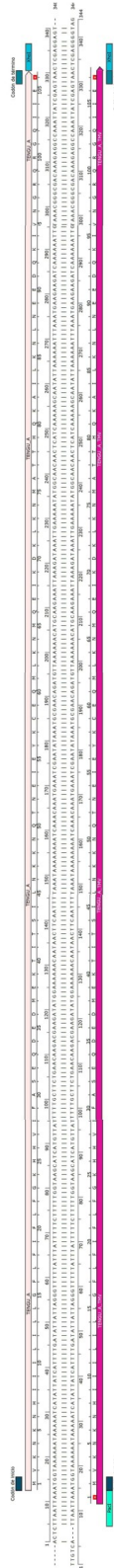
Considerando el número de plantas requeridas para el ensayo y la evidencia que respalda la inoculación de *tengu_strphCL* sin SP, se realizó la inoculación en planta de cuatro vectores virales recombinantes ssRNA (+): *sap54_strphCL* (wt), *tengu:1_90del* y *tengu:1_90del:214_318del*, además del vector control que expresa GFP.

Antecedentes del laboratorio indican que la eficiencia de infección de *N. benthamiana* con el vector viral pBSG1057 es de alrededor del 20%, por lo que utilizaron entre 8 y 10 plantas por vector para obtener al menos 2 réplicas de infección. Sin embargo, en el diagnóstico de los 45 dpi no se obtuvieron plantas infectadas con el virión recombinante que expresara los genes *sap54_strphCL*, *tengu:1_90del*, *tengu:1_90del:214_318del* o *gfp*, con la única excepción de la planta F Nb3, inoculada con el genoma viral que expresa *tengu F* (*tengu:1_90del:214_318del*). El PCR de diagnóstico de F Nb3 indicó un amplicón de 350 pb de inserto en el genoma viral del virus con el que se encontraba infectada, distinto al tamaño esperado de 280 pb para *tengu F*, gen supuestamente contenido en el vector inoculado (**Figura 10**).

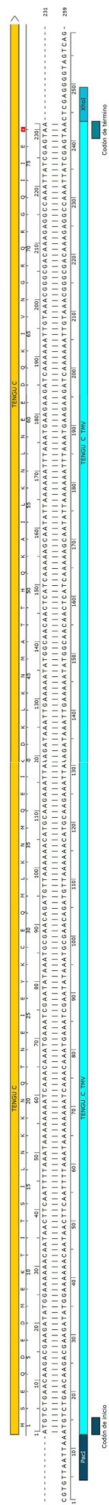
A



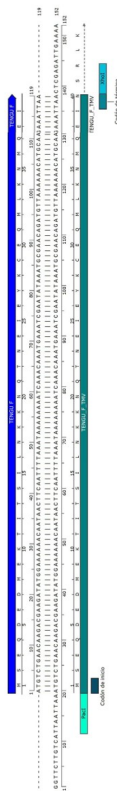
B



C



D



E

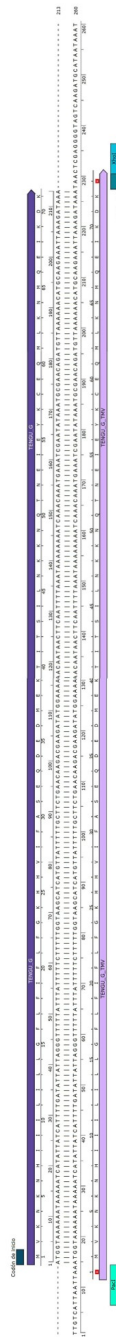


Figura 9. Secuenciación de plásmidos recombinantes pBSG1057-sap54-strphCL, pBSG1057-tengu-strphCL (wt), pBSG1057-tengu-1_90del, pBSG1057-tengu-1_90del-214-318del, pBSG1057-tengu-214_318del. Alineamientos nucleotídicos de los clones recombinantes obtenidos contra la secuencia hipotética del gen de interés. Se destacan los sitios de restricción de las enzimas *PacI* y *XhoI*, los codones de inicio y término artificiales o *wild type* y la traducción de la CDS obtenida. Se obtuvieron todos los clones recombinantes con un 100% de identidad **A**. Alineamiento del plásmido recombinante pBSG1057-sap54-strphCL (wt) contra el gen *wild type* de sap54-strphCL **B**. Alineamiento de pBSG1057-tengu (wt) contra el gen *wild type* de tengu-strphCL **C**. Alineamiento de pBSG1057-tengu-1_90del contra la secuencia hipotética del gen mutante **D**. Alineamiento de pBSG1057-tengu-1_90del-214_318del contra la secuencia hipotética del gen mutante **E**. Alineamiento de pBSG1057-tengu-214_318del contra la secuencia hipotética del gen mutante. Todos los alineamientos se realizaron con ClustalW y se visualizaron en SnapGene.

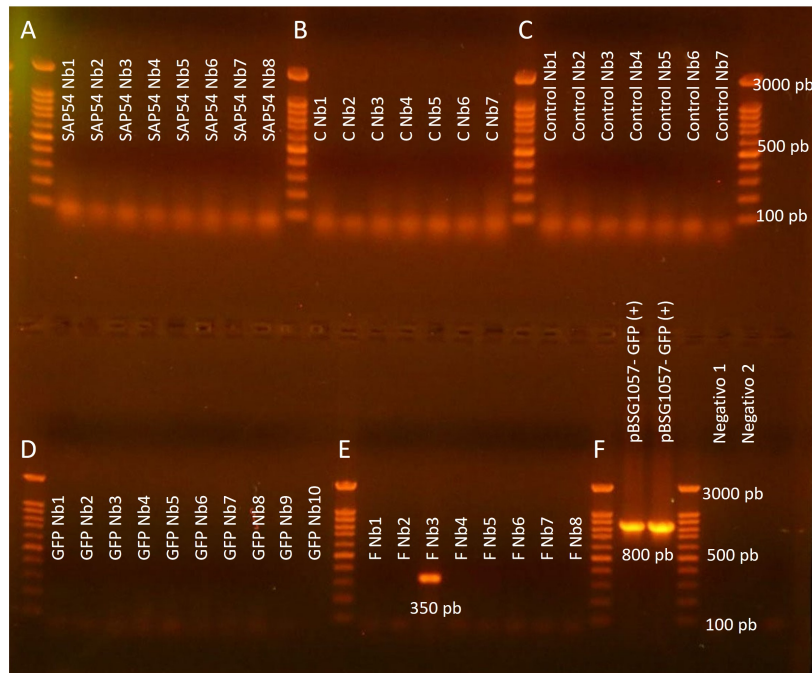


Figura 10. RT-PCR de diagnóstico a los 45 dpi de infección con genomas recombinantes de TMV en plantas de *N. benthamiana*. Los partidores utilizados amplifican 150 pb en total adyacentes al sitio de recombinación (Tabla 12) **A.** *sap54_strphCL* (wt) **B.** *tengu C* (*tengu:1_90del*) **C.** controles sin daño mecánico (Nb1-3) y con daño mecánico (Nb4-7) **D.** *gfp* **E.** *tengu F* (*tengu:1_90del:214_318del*) **F.** Controles positivos de plásmido purificado pBSG1057-*gfp* (tamaño 800 pb), control negativo 1 (PCR) y control negativo 2 (mix de síntesis de cDNA).

La secuenciación de este amplicón de 350 pb indicó que en el genoma del virus se encontraba, con un 100% de identidad, el gen FRU_181 de StrPh que codifica al homólogo de SAP42, nombrado a partir de ahora *sap42_strphCL* (Figura 11). Es decir, la planta se encontraba infectada con un virus recombinante que expresaba *sap42_strphCL* y no *tengu F*. Se descartó una co-infección con dos virus recombinantes realizando un PCR al cDNA del material vegetal infectado utilizando los partidores específicos para los genes *sap42_strphCL* y *tengu F* listados en la Tabla 7 (datos no mostrados).

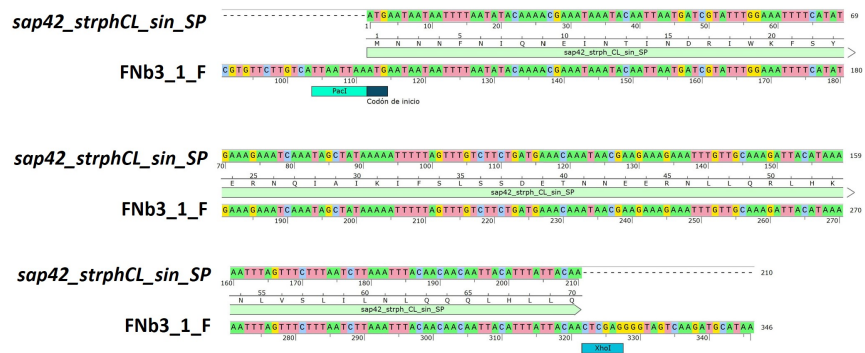
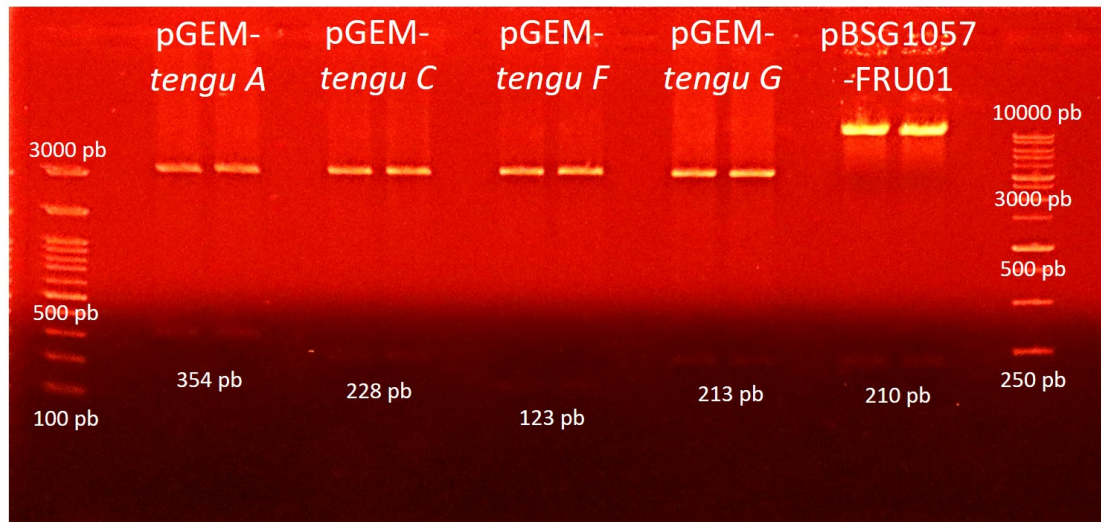


Figura 11. La planta FNb3 de *N. benthamiana* se encuentra infectada con un virus recombinante de TMV que expresa el gen *sap42_strphCL* Alineamiento nucleotídico con un 100% de identidad entre producto de PCR de 350 pb obtenido en la **Figura 10** con la secuencia de *sap42_strphCL*.

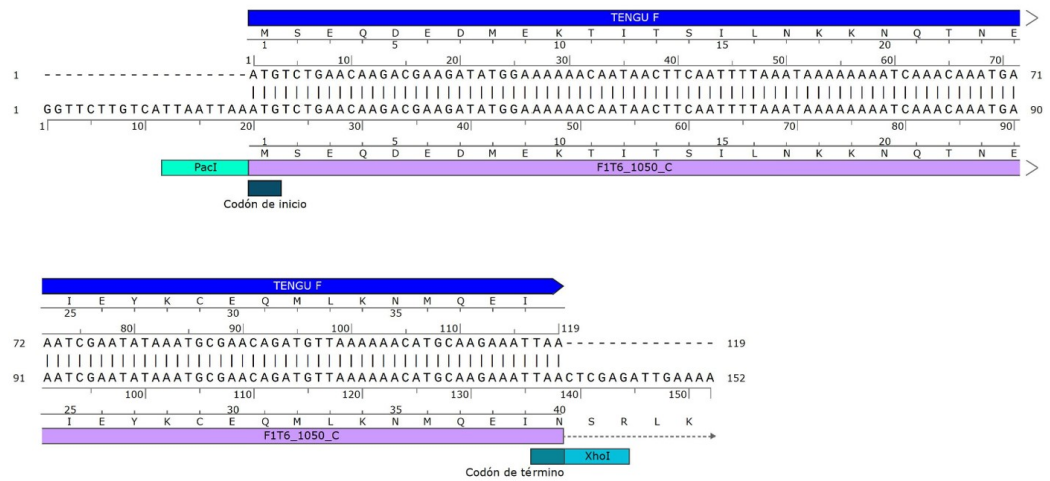
El origen de esta infección con un virus recombinante que no expresa el efector esperado se encuentra en el DNA plasmidial del clon recombinantes de *E. coli* TOP 10 con el vector pBSG1057- *tengu F*, que se había confirmado como portador de este plasmidio por secuenciación (**Figura 9D**). Sin embargo, en una segunda secuenciación de amplicón de PCR con partidores específicos listados en la Tabla 7 se confirma que esta colonia porta el gen *sap42_strphCL* (**Figura 12B**). Por otra parte, en el cromatograma de la primera secuenciación realizada con partidores de *screening* del sitio de recombinación de pBSG1057 (**Figura 12C**) puede observarse ruido inespecífico bajo los *peaks* cromatográficos, que podría deberse al amplicón correspondiente a *sap42_strphCL* enmascarado por el amplicón de *tengu F* (**Figura 12C**). Este ruido no se observó en el cromatograma de la secuenciación de los demás clones recombinantes obtenidos en este trabajo, por lo que sería seguro afirmar que se obtuvieron con éxito el resto de vectores virales (**Figura 9**).

En síntesis, nuestros resultados sugieren que se utilizó una mezcla de plasmidios con origen en el mismo clon recombinante (pBSG1057-*tengu F* y pBSG1057-*sap42_strphCL*) para la transcripción *in vitro* y posterior infección de plantas; en la que tuvo éxito la infección con el virus recombinante de TMV ssRNA (+) que expresa el efector *sap42_strphCL*. Este clon recombinante con los plasmidios pBSG1057-*tengu F* y pBSG1057-*sap42_strphCL* tendría su origen en el subclonamiento de *tengu F* en pBSG1057, ya que el *backbone* de pBSG1057 se obtuvo a partir de la digestión con enzimas de restricción (**Figura 12A**) del vector pBSG1057-*sap42_strphCL* (Metodología, sección 3.4). Es posible que la digestión del *backbone* se haya realizado de forma incompleta, realizándose la transformación de *E. coli* TOP 10 con la mezcla de plasmidios pBSG1057-*tengu F* y pBSG1057-*sap42_strphCL*.

A



B



C

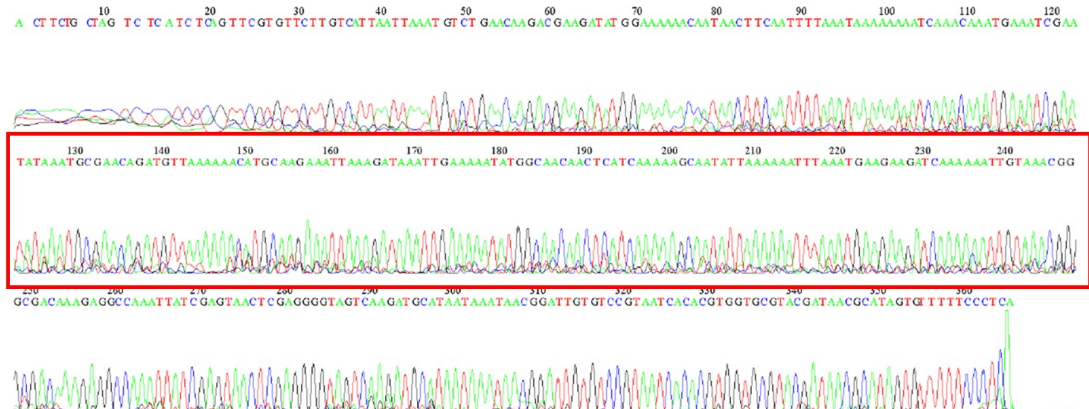


Figura 12. Inoculación de un virus de TMV recombinante que expresa el gen *sap42_strphCL* en plantas de *N. benthamiana*. A. Electroforesis en gel de agarosa al 0,8% en la que se observa la digestión de plásmidos con *PacI* y *XhoI*. Se observa una banda de 210 pb como producto de digestión de pBSG1057-FRU01, que corresponde al tamaño esperado. Además, se observa una banda a los 10.000 pb, tamaño del vector pBSG1057 linealizado B. Alineamiento nucleotídico de plásmidos extraídos de la colonia F1T6_1050_C contra el gen *tengu F* (*tengu:1.90del:214_318del*) en el que se observa la identidad de la secuenciación con este gen C. Cromatograma de la secuenciación con el partidor *forward* de diagnóstico de virus recombinante. En un cuadrado rojo, se destaca el ruido bajo los *peaks* cromatográficos que podrían corresponder al gen *sap42_strphCL*.

6.4 Síntomas de plantas de *N. benthamiana* infectadas con viriones recombinantes de TMV que expresan el gen *sap42_strphCL*

La planta F Nb3 diagnosticada con el virión recombinante de TMV que expresa el gen *sap42_strphCL* no presentó síntomas visibles de infección (**Figura 13A**) hasta los 10 dpi, después de los cuales se observaron alteraciones en el tejido vegetativo de la planta, como proliferación de brotes en los internodos y hojas rugosas y enrolladas hacia el envés (**Figura 13B**). Estos síntomas se agravaron desde los 45 dpi con la aparición de ampollas en las hojas (**Figura 13C**) y zarcillos en el tallo (**Figura 13D**), además del desarrollo de que hojas filiformes a los 75 dpi en el extremo apical de la planta (**Figura 13E**). Todos los síntomas descritos en tejido vegetativo fueron acumulativos a lo largo del tiempo y se presentaron hasta los 105 dpi.

Por otra parte, desde los 28 dpi se observó una alteración de la arquitectura de la planta, presentando una disminución de la altura respecto a los controles hasta los 105 dpi (**Figura 14A**), aun cuando se pudo observar un alargamiento del tallo en estadios más avanzados de desarrollo (**Figura 14A y B**). Además, se pudo observar un acortamiento de los internodos de planta desde los 28 dpi (**Figura 15**), por lo que se podría afirmar que la planta F Nb3 presenta síntomas típicos de enanismo. Por otra parte, desde los 45 dpi se pudo observar claramente el desarrollo de más de un tallo principal en FNb3, aun cuando las plantas de *N. benthamiana* sólo poseen un tallo principal (**Figura 15**).

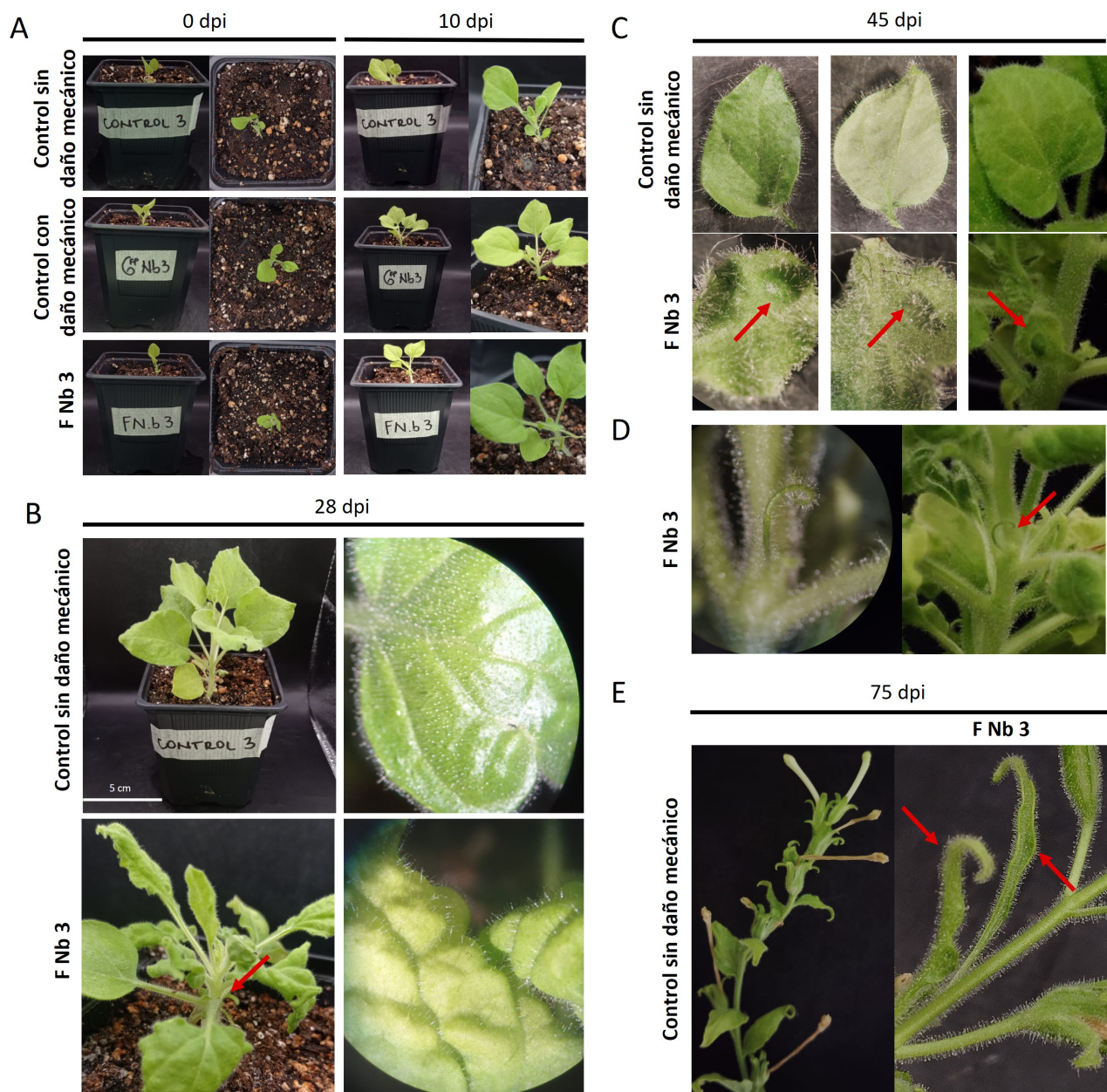


Figura 13. La planta de *N. benthamiana* infectada con un virus recombinante de TMV que expresa el gen *sap42-strphCL* presenta alteraciones en el desarrollo de tejido vegetativo desde los 28 dpi. **A.** Plantas control con y sin daño mecánico presentan un fenotipo semejante a la planta infectada F Nb3 hasta los 10 dpi **B.** La planta F Nb3 presenta hojas rugosas (flecha roja) respecto al control sin daño mecánico. **C.** A partir de los 45 dpi, se observa la aparición de ampollas en las hojas de F Nb3. En la parte superior, una hoja *wild type* bajo lupa 40x; y en la parte inferior, una hoja de F Nb3 con ampolla (flechas rojas) **D.** Aparición de zarcillos a los 45 dpi. Las plantas *wild type* no presentan zarcillos **E.** A la izquierda, se observa el extremo apical de una planta sin daño mecánico que presenta hojas de forma oblanceolada; a la derecha, con flechas rojas, hojas filiformes de F Nb3.

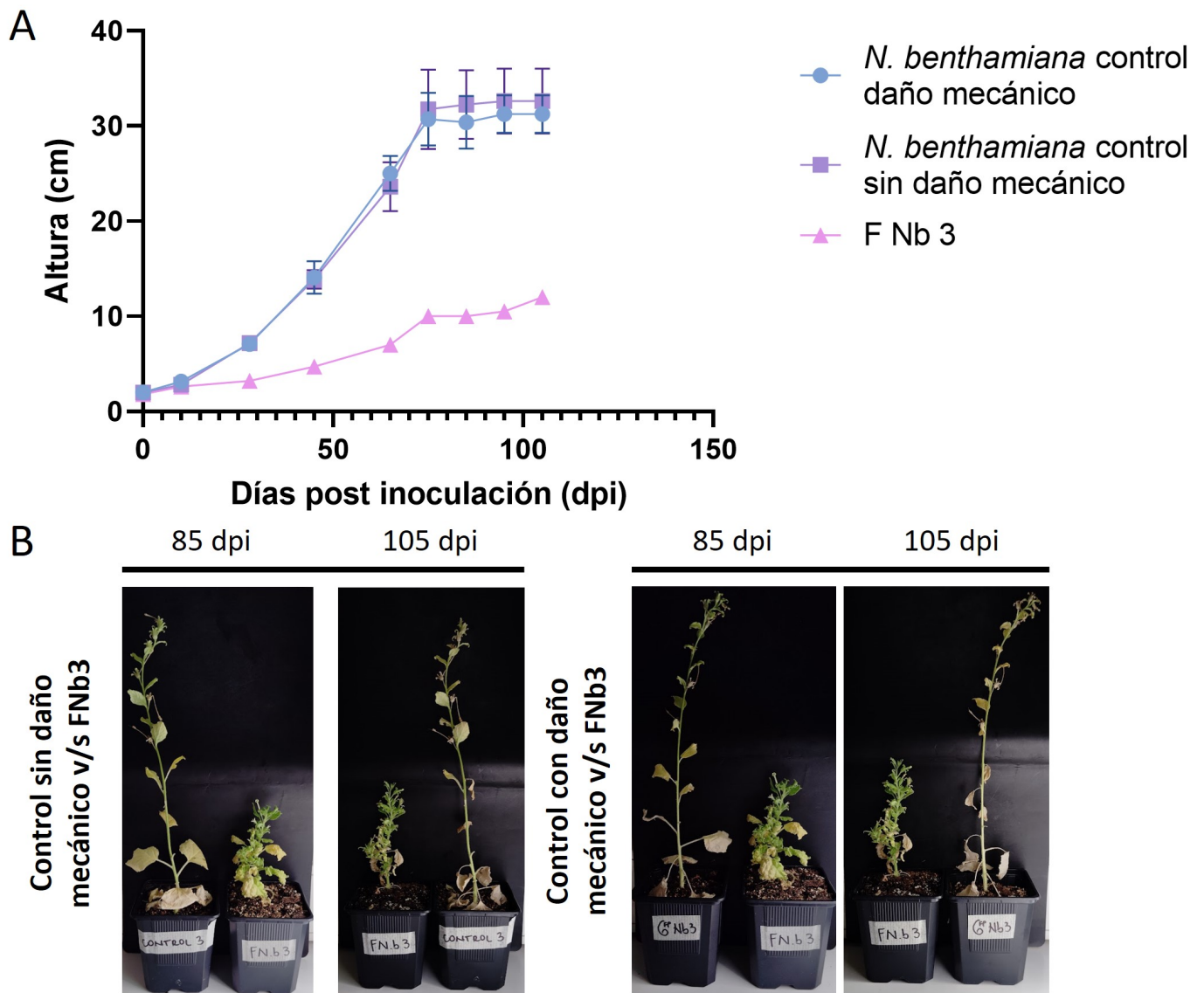


Figura 14. La planta de *N. benthamiana* infectada con un virus recombinante de TMV que expresa el gen *sap42-strphCL* son más pequeñas que los controles con y sin daño mecánico hasta los 105 dpi. **A.** Gráfico de crecimiento de plantas de *N. benthamiana* control con daño mecánico (n=29), *N. benthamiana* control sin daño mecánico (n=3) y FNb3. Se observa que FNb3 presenta un tercio de la altura que sus contrapartes control, y que comienza a crecer levemente entre los 85 y 105 dpi **B.** Fotografías a los 85 y 105 dpi de FNb3 y los controles con y sin daño mecánico. Se puede observar que FNb3 comienza a elongar el tallo entre los 85 y 105 dpi; llegando a alcanzar 20 cm a los 150 dpi (datos no mostrados).

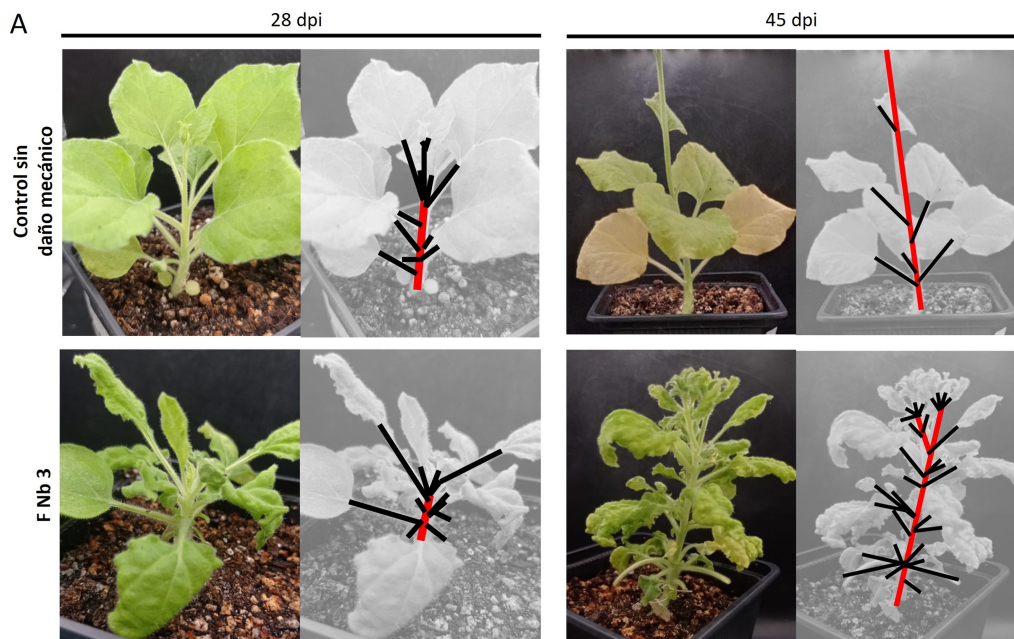


Figura 15. La planta de *N. benthamiana* infectada con un virus recombinante de TMV que expresa el gen *sap42_strphCL* presenta un acortamiento de los internodos. Fotografías de arquitectura de controles con y sin daño mecánico v/s FNb3. A la derecha de cada fotografía se puede observar destacado en rojo el tallo principal y en negro el pecíolo de las hojas. Las hojas de *N. benthamiana* control nacen desde un tallo principal intercaladamente y se puede observar un espaciamiento entre los nodos, mientras que en FNb3 se puede observar el acortamiento de los internodos desde los 28 dpi y la aparición de más de un tallo principal a partir de los 45 dpi.

Además de las alteraciones en el tejido vegetativo y la arquitectura de F Nb3, se observaron diferentes alteraciones florales en todas las flores de la planta observadas hasta los 105 dpi. Éstas incluyen pérdida de la anatomía de la flor como flores más cortas, alteraciones en la simetría, forma o color de los pétalos, además de alteraciones en la longitud, tamaño o ubicación de los estambres y anteras (**Figura 16A-J**) respecto a las flores control (**Figura 17A-H, M-Ñ**).



Figura 16. La planta de *N. benthamiana* infectada con un virus recombinante de TMV que expresa el gen *sap42_strphCL* presenta diversas alteraciones florales. A. Presencia de flores más pequeñas sin alteraciones en estambres o anteras **B.** Flor de tamaño normal con alteraciones en la morfología de los pétalos y estambres **C.D.H.** Fotografía 40x de alteraciones en la morfología y color de los pétalos **E.F.G.** Se pueden observar alteraciones de la morfología de los estambres en la flor destacadas con las flechas rojas; además de la aparición de pétalos en estadios más avanzados de senescencia de la flor. **I.J.** Alteraciones en la simetría de la flor, en las que se forma sólo la mitad de pétalos

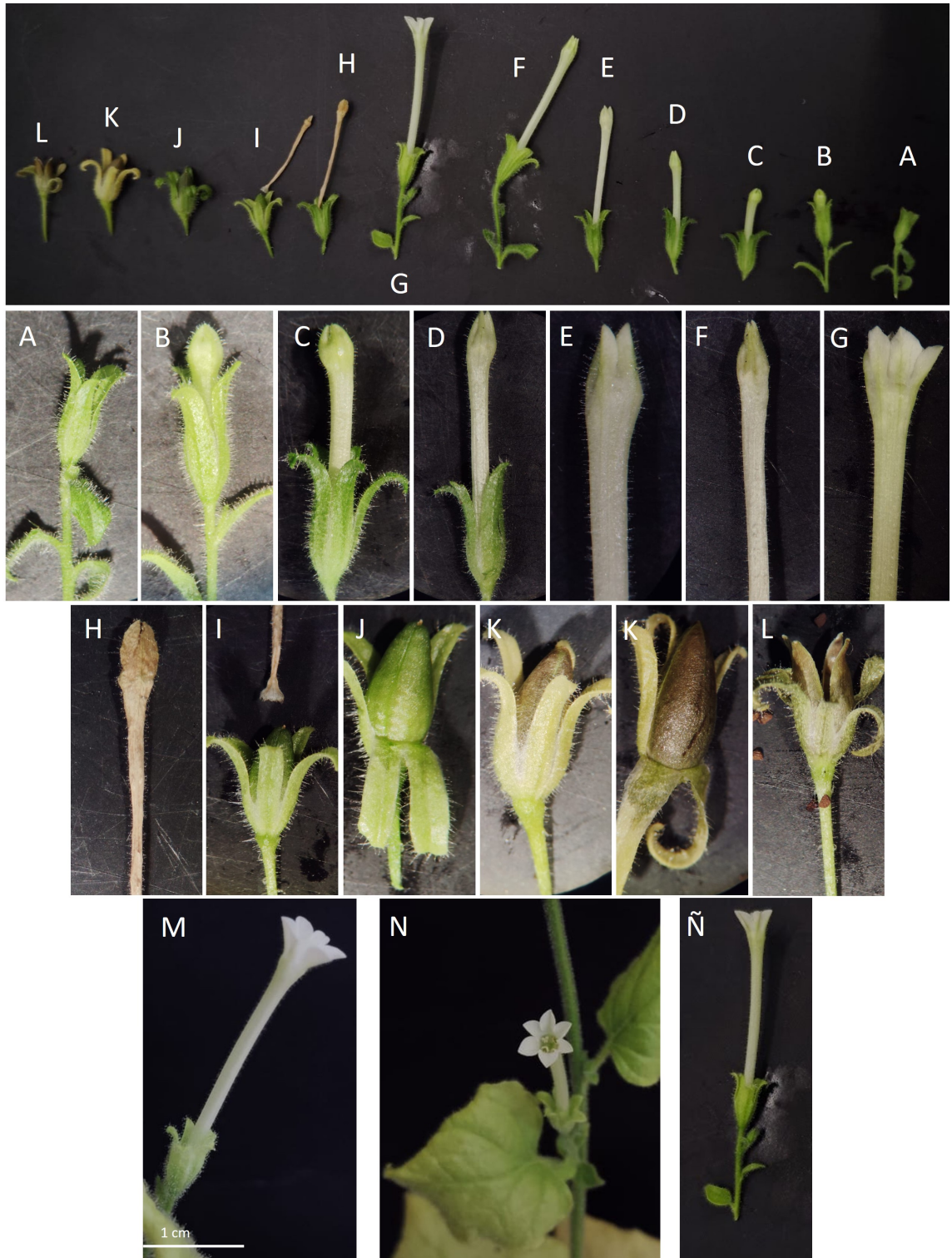


Figura 17. Progresión de desarrollo de flores y frutos de *N. benthamiana* wild type. A-H. Desarrollo de flores de *N. benthamiana* a través del tiempo M-Ñ. Antesis de flor de *N. benthamiana* H-L. Desarrollo de frutos de *N. benthamiana* hasta la dehiscencia (L).

Si bien en la anatomía de las flores no se observó una alteración de la morfología del pistilo, se puede observar una retención del pistilo desde la senescencia de la flor hasta la formación del fruto (**Figura 18A-H**), a diferencia de los frutos control. Los frutos de *N. benthamiana* corresponden a cápsulas ovoides (de angular a obtuso) de color café que al alcanzar la dehiscencia arrojan semillas esféricas (**Figura 17I-L**). Los frutos de F Nb3 no alcanzaron la dehiscencia y permanecieron de un color verde que palideció a medida que pasó el tiempo, por lo que se desconoce si los frutos contienen semillas en su interior (**Figura 18I**).

Por otra parte, se replicó el fenotipo observado en plantas de *N. benthamiana* infectadas con un virus recombinante que expresa *sap42_strphCL*, obteniendo con éxito 11 replicados utilizando el protocolo mencionado en la sección 5.5.4 de Metodología. Se observó la misma sintomatología tanto para tejido vegetativo como tejido reproductivo en plantas infectadas (**Figura 19**).

En síntesis, la planta infectada con un virión recombinante de TMV que expresa el gen *sap42_strphCL* presenta alteraciones foliares, síntomas de enanismo, alteraciones florales y de fruto que permanecen hasta los 105 dpi aun cuando los controles del ensayo ya alcanzaron la senescencia en este tiempo. Esto podría sugerir que los síntomas inducidos por *sap42_strphCL* provocarían una extensión de la vida de la planta, generando un fenotipo de crecimiento vegetativo incluso cuando ya se han desarrollado flores, lo que beneficiaría el crecimiento de insectos vectores en la planta infectada y la propagación de fitoplasma (Bertaccini 2022).

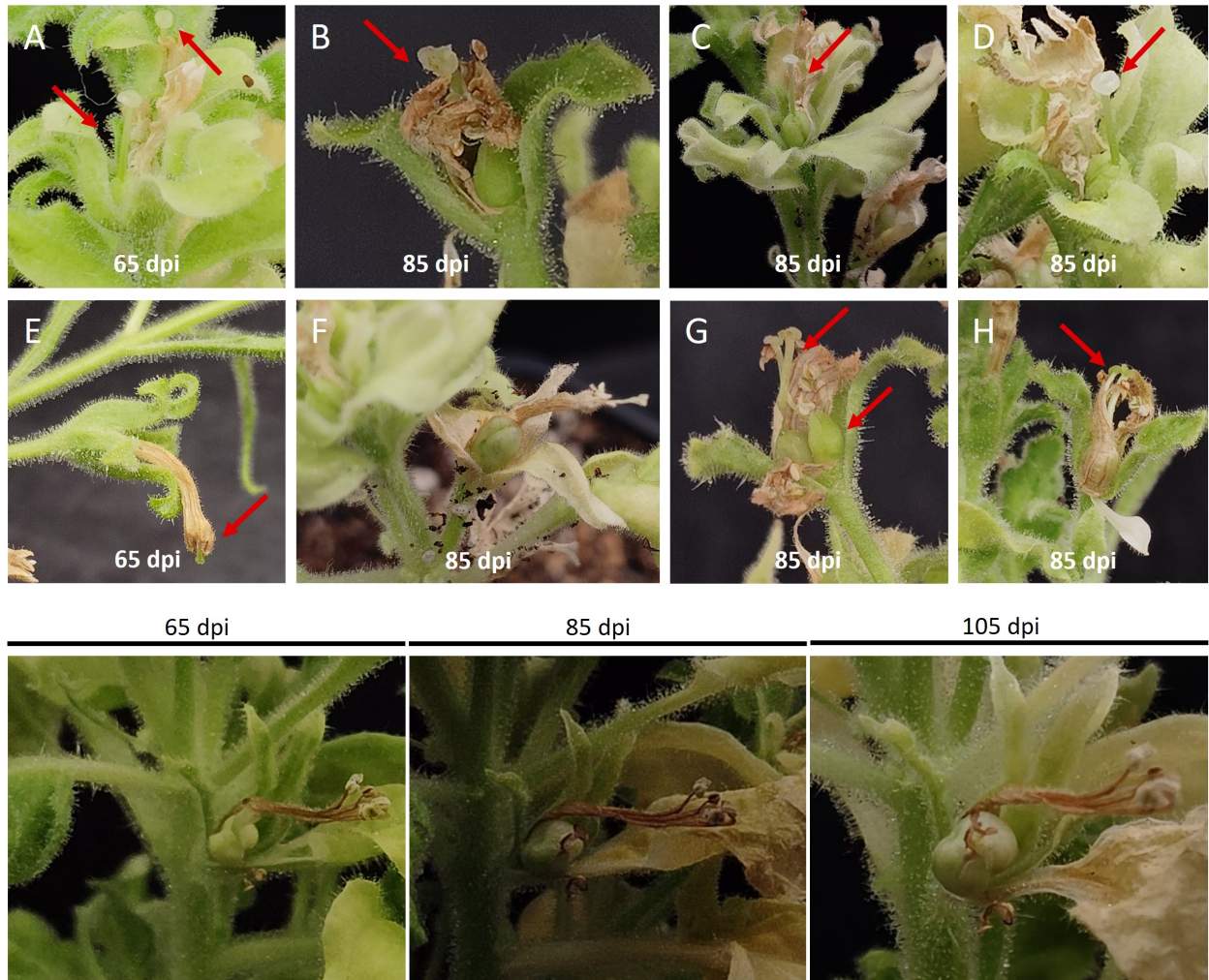


Figura 18. La planta de *N. benthamiana* infectada con un virus recombinante de TMV que expresa el gen *sap42-strphCL* presenta alteraciones en el desarrollo del fruto. A-E. Fotografías de frutos de FNb3 con retención de pistilo señalado con flechas rojas. **F.** Fruto con morfología y color alterados. **G.** Formación de frutos dobles. Se destacan con flechas rojas los pistilos de cada uno de los frutos. **H.** Aparición de pétalos durante la formación de frutos. En rojo se señala el pistilo retenido. **I.** Desarrollo de un fruto desde los 65 a los 105 dpi con morfología alterada y que no alcanza la dehiscencia. Ninguno de los frutos expuestos en los paneles A-H alcanzó la dehiscencia.

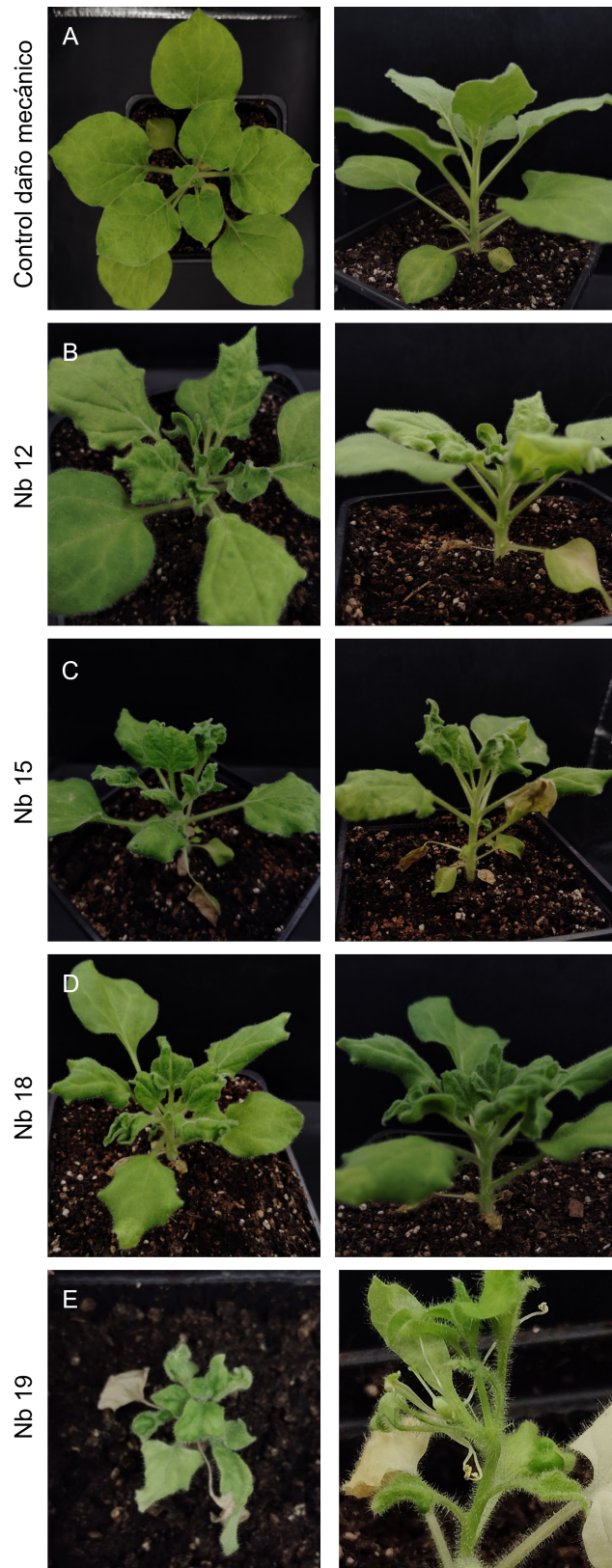


Figura 19. El fenotipo de plantas de *N. benthamiana* infectadas con un virus recombinante de TMV que expresa el gen *sap42-strphCL* es replicable. A Control de *N. benthamiana* con daño mecánico. No se observan alteraciones en la morfología de la flor ni en tejido vegetativo . **B.** Fenotipo de hojas arrugadas y ampollas **C.** Aparición de ampollas en hojas. **D.** Fenotipo de hojas arrugadas, enrolladas hacia el envés y acortamiento de los internodos **E.** Alteraciones del fruto con retención de pistilo y presencia de estamen alargado.

7 Discusión

7.1 Síntomas de retraso en el desarrollo floral, retraso de elongación de tallo y aumento de área foliar en *Arabidopsis thaliana* ecotipo Shahdara infectadas con fitoplasma StrPh-CL

Los fitoplasmas son patógenos intracelulares estrictos, lo que dificulta su cultivo axénico. Si bien se ha desarrollado técnicas de cultivo axénico para algunos subgrupos ribosomales (Contaldo et al. 2012; 2016), las técnicas de cultivo consisten en la conservación en planta de material infectado, en invernaderos o cultivo in vitro. En este trabajo, para la transmisión de StrPh-CL a la planta modelo *A. thaliana* Sha, se descartó la utilización de injertos de vinca infectada, debido a la incompatibilidad que presenta con esta planta modelo. Por este motivo, para la obtención de plantas infectadas con StrPh-CL, se realizó un ensayo de transmisión con los insectos vectores *Cixiosoma* sp. capturados en campo.

Se consideró, por experiencia de laboratorio, que aproximadamente el 20% de los insectos capturados en campo de este género son portadores de fitoplasma. Esto explicaría la baja tasa de infección de plantas (6,8%) obtenidas en el ensayo de transmisión. Además, es importante considerar que el período de latencia de fitoplasma en insectos depende tanto de la cepa de fitoplasma como de la especie de insecto; pudiendo durar desde 28 días (Pacífico et al. 2015; Koinuma et al. 2020) hasta períodos más largos como 80 días (Murrall et al. 1996; Moya-Raygoza et al. 1998). El diagnóstico de fitoplasma en insectos se realizó utilizando el individuo completo, por lo que, si bien fue posible detectar el patógeno, no es posible determinar si se encontraba en un estadio de infección en el que fuese transmisible desde estos insectos a hospederos vegetales.

La infección por fitoplasma es persistente y propagativa, es decir, una vez adquirida la infección por el hospedero la mantiene durante toda su vida y puede transmitirla a otros individuos (Bertaccini et al. 2009). Sin embargo, luego del ensayo de transmisión sólo fue posible detectar la infección en una ocasión en cada uno de tres individuos diferentes de *A. thaliana*, a los 10, 40 o 70 días post exposición, sin detectarse fitoplasma en recolecciones

posteriores de material vegetal de estos individuos. Esta inconsistencia en la progresión de la infección puede deberse a la frecuencia de la recolección de material vegetal, lo que disminuyó la carga bacteriana del patógeno y por consiguiente la carga bacteriana en la planta. Además, aquellas plantas expuestas a una mayor cantidad de insectos infectados se ven más expuestas a fitoplasma, logrando una mayor carga bacteriana y consecuente desarrollo de síntomas visibles, como es el caso de la planta sintomática I-A que se expuso a 2 insectos infectados; a diferencia de las plantas asintomáticas F-C y E-A que estuvieron expuestas a sólo 1 insecto con fitoplasma StrPh-CL.

Por otra parte, una baja carga bacteriana en los hospederos vegetales puede implicar que la cantidad de cDNA de fitoplasma obtenido a partir de las muestras vegetales se encuentre bajo el límite de detección de 1×10^{-3} ng correspondiente a la técnica de PCR anidado con los primers universales P1/P7//F2/R2n (Gundersen et al. 1996), lo que podría explicar el posterior diagnóstico negativo de fitoplasma en aquellas plantas en las que se detectó alguna vez durante el ensayo de transmisión.

Aún con la baja tasa de infección de *A. thaliana* Sha, es posible afirmar que los síntomas observados de retraso en el desarrollo floral, retraso en la elongación de tallo y aumento del área foliar de la planta diagnosticada con StrPh-CL se deben a la infección por fitoplasma, ya que ninguna de las 32 plantas control con exposición a insectos sin StrPh-CL presentaron estos síntomas, descartando el estrés biótico como causante de éstos. Sin embargo, los síntomas observados en la planta infectada con StrPh-CL no se condicen con lo esperado, ya que los síntomas de infección observados en campo corresponden a filodia severa en frutillas (Cui et al. 2019) y virescencia en plantas infectadas de vinca obtenidas en laboratorios, sin observarse alteraciones en la altura o área foliar (Cui et al. 2024). Aun así, en *A. thaliana* Sha se observó el retraso del desarrollo de flores, principal órgano afectado por StrPh-CL en campo. Esto puede deberse tanto a la carga bacteriana discutida anteriormente, como la utilización de un nuevo modelo de hospedero, en el que pueden variar los síntomas de la enfermedad causada por StrPh-CL.

Por otra parte, los síntomas observados de alargamiento de la fase vegetativa adulta se condicen con otros cambios morfológicos en plantas causados por fitoplasma descritos en la literatura, en los que se describe un fenotipo de mayor crecimiento vegetativo y “rejuvenecimiento” de las plantas (Sugio et al. 2011; MacLean et al. 2014a; Pecher et al. 2019; Huang et al. 2020; Bertaccini 2022; Huang et al. 2022), lo que causan una mayor atracción de insectos vectores hacia plantas infectadas y la consecuente oviposición en sus hojas para repetir el ciclo infectivo del patógeno.

7.2 Selección de genes que codifican homólogos a SAP54 y Tengu de StrPh-CL para expresión heteróloga en *N. benthamiana*

Tradicionalmente, la investigación de efectores en una variedad de especies de fitoplasma ha descrito diferentes ortólogos de efectores patogénicos causantes de síntomas visibles en planta, es decir, aquellos que contribuyen a la patogenicidad de los fitoplasmas. Estos ortólogos pueden agruparse en las familias/tribus de SAP11, SAP54, Tengu y SAP05, de las cuales homólogos de los efectores SAP54 y Tengu están codificadas en el genoma de StrPh-CL. Sin embargo, se desconoce si éstos son parte del “switch” metabólico de StrPh CL y, por lo tanto, si se encuentran sobreexpresados en planta, lo que sugeriría un rol de estos efectores en la virulencia de este fitoplasma en hospederos vegetales. Es por ello, que en este trabajo se esperaba realizar un análisis comparativo mediante qPCR de los mensajeros de efectores patogénicos de StrPh-CL, similar a lo descrito en la literatura en otras cepas de fitoplasma (Toruño et al. 2010; Oshima et al. 2011; MacLean et al. 2014b), con el fin de dilucidar cuáles efectores se encontraban sobreexpresados en planta v/s insecto y determinar así los efectores probablemente causantes de la sintomatología de StrPh-CL en hospederos vegetales.

Entre los genes de StrPh-CL sobreexpresados en planta, se esperaba encontrar los genes que codifican homólogos de Tengu y SAP54 de StrPh-CL, pertenecientes a las familias de ortólogos cuya participación en virulencia se ha demostrado. Sin embargo, si bien se validaron partidores para 8 genes que codifican candidatos (entre los que se incluyen SAP54 y Tengu) y dos genes *housekeeping* de StrPh CL, no fue posible realizar el qPCR debido a que no se detectó emisión del intercalante fluorescente BRYT Green® con el equipo disponible en laboratorio, aun cuando sí se pudo detectar amplificación mediante electroforesis en gel de agarosa en muestras de cDNA de plantas e insectos en las que no se detectó fluorescencia. Por ese motivo, se descartó la estrategia experimental para la elección de genes que codifican candidatos a efectores fitopatogénicos.

Así, se decidió abordar un enfoque bibliográfico que sugería que los homólogos de Tengu y SAP54 eran los candidatos que con mayor probabilidad contribuirían a la virulencia de StrPh-CL (Hoshi et al. 2009; MacLean et al. 2011; Sugawara et al. 2013; Minato et al. 2014; Iwabuchi et al. 2020), a diferencia de los 6 SAPs restantes a los que no se les ha evaluado su contribución a la virulencia en plantas. Por otra parte, la homología en un 95% del homólogo de SAP54 de StrPh-CL con el homólogo encontrado el fitoplasma 16SrIII-J sugiere que StrPh-CL podría haber adquirido el gen mediante transferencia horizontal, lo que respalda la posible contribución a la virulencia del efector ya que el homólogo del fitoplasma 16SrIII-J causa filodia en plantas (Gamboa et al. 2019).

Además, este efector inhibe el desarrollo floral en plantas transgénicas de *A. thaliana*, manteniendo la planta en un estado de roseta vegetativa (Fernandez et al. 2018).

Por otra parte, es posible que la filodia observada en campo se deba a una alteración floral en su extremo causada por cambios en la vía de señalización de JA y auxinas, vías hormonales que interrumpe al expresión heteróloga de Tengu en otros modelos vegetales causando esterilidad de flores (Hoshi et al. 2009; Minato et al. 2014). Además, *tengu_strphCL* presenta homología con otros homólogos causantes de síntomas en plantas, específicamente en el péptido activo (Sugawara et al. 2013) por lo que es posible que la contribución a la virulencia de Tengu pueda explicar los síntomas de StrPh-CL observados en campo.

Considerando que el homólogo de Tengu en StrPh-CL posee un péptido de 30 aminoácidos (P) en el extremo carboxilo terminal que no presenta homología en ningún otro gen de la familia descrito hasta la fecha (Cui, et al. 2022; Wang et al. 2014), es que se construyeron variantes del de *tengu_strphCL* sin el péptido señal que portaran y no portaran el péptido P, con el objetivo de determinar si la contribución a la virulencia del gen se ve afectada por esta inserción.

Dado que los antecedentes bibliográficos del efector SAP54 sugieren que el homólogo en StrPh-CL podría ser el causante de síntomas en plantas, en el laboratorio se realizó con anterioridad la infección de plantas de *N. benthamiana* con un virus recombinante que expresaba *sap54_strphCL* sin péptido señal, obteniéndose plantas infectadas con el vector recombinante sin ningún tipo de síntomas (resultados no mostrados). Con estos antecedentes, no se explica la razón por la cual el gen *sap54_strphCL* no causaría síntomas en plantas; por lo que en este trabajo se realizó la construcción del gen *sap54_strphCL* con el péptido señal con el objetivo de comprobar o descartar la patogenicidad de este efector en StrPh-CL.

7.3 El gen homólogo de SAP42 en StrPh-CL es un efector fitopatogénico capaz de inducir alteraciones foliares, florales, frutales y de arquitectura de la planta en *N. benthamiana*

Aun cuando se construyeron con éxito los vectores virales para los genes *tengu_strphCL* y *sap54_strphCL* y se inocularon en planta, la inoculación sólo fue exitosa con el vector viral recombinante que expresó *sap42_strphCL*. La aparición de un fenotipo enano con alteraciones florales, foliares y de frutos en la planta infectada con un virión recombinante que expresa *sap42_strphCL* indicaría que este efector es fitopatogénico, siendo el primer reporte que indica que SAP42 es capaz de inducir síntomas en plantas. Esta premisa es

posible debido a que, se han realizado en dos ocasiones experimentos en nuestro laboratorio de inoculación del control del vector viral que expresa GFP por triplicado en las plantas modelo de *N. benthamiana* y *A. thaliana*; observándose fenotipos idénticos al control en ambas ocasiones. Esto indica que los síntomas observados en plantas infectadas no se deben a la acción del vector viral. Asimismo, al contar con controles con y sin daño mecánico se puede descartar que el fenotipo observado en la planta infectada con un virión recombinante que expresa *sap42_strphCL* se debe a estrés abiótico causado por daño mecánico.

El gen *sap42_strphCL* no se encuentra entre las cuatro tribus descritas de efectores de fitoplasma, y corresponde a un candidato a efector clásico de fitoplasma ya que posee un péptido señal para su traslocación vía SecA, un dominio transmembrana y secuencias características denominadas Sequence Variable Mosaic (SVM) (Jomantiene et al. 2007), que se encuentran en los fitoplasmas debido a interacciones de fagos en estadios tempranos de su evolución (Wei et al. 2008). La primera identificación de SAP42 se realizó en 2009, en conjunto con el descubrimiento del efecto patogénico SAP11 (Bai et al. 2009). En ese trabajo, se hipotetiza que SAP42 (junto con SAP11, SAP22 y SAP30) alterarían la expresión génica de la célula vegetal debido a que poseen un dominio bipartito de localización nuclear (NLS), por lo que estos efectores ingresarían directamente al núcleo de la célula vegetal. Sin embargo, en éste trabajo sólo se profundizó en la virulencia del gen SAP11.

Por otra parte, en 2011 se menciona que SAP42 se expresa en planta, pero no se encuentra significativamente sobreexpresado en *Arabidopsis thaliana* v/s *Macrosteles quadriclineatus* (MacLean et al. 2011). Posteriormente, no se realizaron menciones de SAP42 hasta 2023, cuando se clasificó este efector mediante el análisis de motivos proteicos dentro de la Tribu 1, una de las tribus que agrupa proteínas ampliamente distribuidas entre diferentes especies de fitoplasma (Carreón-Anguiano et al. 2023), y se confirmó la presencia de una SVM predicha en 2009 (Bai et al. 2009).

Paralelamente, se realizó un estudio que utilizó un sistema de doble híbrido en levadura para construir redes de interacción proteína-proteína entre 21 efectores de fitoplasma y 1980 factores de transcripción y reguladores transcripcionales de *A. thaliana*. Con este enfoque se determinó que SAP42 del fitoplasma AYWB presenta interacciones proteína-proteína con los TCP de clase I TCP14, 19 y 23; el TCP de clase II TCP4 y el factor de transcripción LBD15 (Correa Marrero et al., 2024). Dado que el homólogo de SAP42 de StrPh-CL comparte un 80% de identidad aminoacídica con SAP42 de AYWB, es plausible proponer que estas interacciones proteína-proteína con estos factores de transcripción podría estar ocurriendo en el homólogo de StrPh-CL.

Los TCP (TEOSINTE BRANCHED1, CYCLOIDEA, PROLIFERATING CELL NUCLEAR ANTIGEN FACTOR1) son una veintena de factores de transcripción exclusivos de plantas que comparten un dominio no canónico bHLH, que les permiten interacción con DNA y otras proteínas (Cubas et al. 1999). Participan en una variedad de procesos biológicos como ciclos circadianos (Giraud et al. 2010) y desarrollo de órganos como flores (Luo et al. 1999) y hojas (Sarvepalli et al. 2011). Se ha demostrado que TCP14 reprime la proliferación celular de tejido foliar; y la aumentan en internodos jóvenes (Kieffer et al. 2011). Por lo tanto, la inhibición de la función de TCP14 debido a una interacción con SAP42_StrPhCL podría explicar la aparición de síntomas en hojas como hojas rugosas (Figura 13B) y ampollas (Figura 13C); que se generan por excesiva proliferación celular del tejido foliar. Además, esta interacción explicaría el acortamiento de los internodos observados en la planta infectada (Figura 15).

Además, es posible que la interacción entre SAP42_StrPhCL y TCP14 interrumpa el desarrollo floral, ya que TCP14 regula la formación de rosetas en *A. thaliana* (Xu et al. 2024) y la maduración de frutos mediante la regulación de factores de respuesta a auxinas (ARFs) (Nagpal et al. 2005); información que se condice con las alteraciones florales (Figura 16) y de frutos observadas (Figura 18). En específico, TCP14 modula la respuesta a auxinas en planta mediante la expresión de ARF6, factor de transcripción que además regula la elongación del hipocótilo (Ferrero et al. 2021) por lo que la interacción entre SAP42_StrPhCL y TCP14 podría conllevar a menor altura de la planta, síntoma observado en la planta infectada (Figura 14). Es importante considerar que la regulación negativa de los ARF6 y ARF8 causada por el efector patógeno Tengu induce enanismo en plantas y esterilidad de flores (Minato et al. 2014).

La interacción hipotética entre SAP42_StrPhCL y TCP19 en la que TCP19 perdería su función, causaría un retraso en la senescencia de la planta (Danisman et al. 2013) fenotipo que se observa en plantas modelo infectadas con StrPh-CL obtenidas esta tesis (Figura 6); además de una supresión de la inmunidad inducida (Kim et al. 2014; Mukhtar et al. 2011) y un aumento de la preferencia de los insectos por la planta infectada (Fan et al. 2020); ambas debidas a la disminución de JA en la planta. Cabe mencionar que se ha demostrado que el efector SAP11 disminuye la síntesis de jasmonatos en planta mediante la interacción proteína-proteína con 8 TCPs (Chang et al. 2018); aumentando la oviposición de insectos sanos en plantas infectadas con fitoplasma (Sugio et al. 2011); por lo que se puede observar una semejanza en las alteraciones en las cascadas de señalización que causaría *sap42_strphCL* con otros efectores de fitoplasma conocidos.

Por otra parte, el fenotipo de flores con pétalos cortos (Figura 14A-I) observado en la planta infectada con el virión recombinante podría explicarse por una pérdida de función

de TCP23, ya que plantas *knock-down* de este factor de transcripción presentan sépalos largos y pétalos cortos (Aguilar Martinez et al. 2013); además de desarrollo de hojas pequeñas arrosietadas y disminución de la altura de la planta (Zhang et al. 2019). Este fenotipo de disminución de altura se condice con lo observado en la planta infectada con StrPh-CL (Figura 5) como con la expresión heteróloga de SAP42_StrPhCL (Figura 14). Esto sugiere que SAP42_StrPhCL provocaría la pérdida de función de TCP23.

Otro fenotipo observado en la planta que expresa heterológamente SAP42_StrPhCL es falta de coloración o coloración tardía de pétalos (Figura 14D, F y H); que se explicaría por la pérdida de función de TCP4 que se une directamente a los promotores de genes que codifican a factores de transcripción relacionados con la síntesis de clorofila, inhibiendo su expresión (Zheng et al. 2022). El efector de fitoplasma SAP11 del fitoplasma cepa AYWB causa el síntoma de escoba de brujas mediante la desestabilización de 8 integrantes de TCP-C en *A. thaliana*, incluyendo TCP4 (Chang et al. 2018), lo que sugiere que podrían existir mecanismos moleculares redundantes dentro de los efectores de fitoplasma para causar un fenotipo en plantas.

El síntoma de aparición de zarcillos y hojas filiformes (Figuras 13C y D) podría deberse a un aumento de la expresión de LBD, ya que plantas transgénicas que sobreexpresan LBD15 presentan un fenotipo de hojas con forma de aguja sin tricomas (Sun et al. 2013). Además, es posible que la aparición de hojas filiformes a los 75 dpi se deba a un fenotipo atenuado o bien un estado intermediario entre los zarcillos u hojas con forma de aguja y el fenotipo normal. Por lo tanto, cabe hipotetizar que SAP42_StrPhCL, por algún mecanismo desconocido, aumentaría los niveles de expresión de LBD15 mediante interacción proteína-proteína.

En general, tanto los síntomas observados en la planta de *A. thaliana* infectada con StrPh-CL: aumento de área foliar (Figura 4, 5) disminución de la altura de la planta (Figura 5) y retraso de estructuras reproductivas (Figura 6); como los síntomas observados en la planta de *N. benthamiana*: enanismo (Figura 14, 15), hojas rugosas (Figura 13), aparición de zarcillos (Figura 13), alteraciones florales (Figura 16) y de frutos (Figura 18) se podrían explicar por la presencia del efector fitopatogénico SAP42_StrPhCL. Este efector tendría mecanismos moleculares de acción en común con los efectores canónicos Tengy y SAP11, lo que nos podría indicar una redundancia de las cascadas de señalización que tienen como objetivo los efectores patogénicos de fitoplasma, utilizando mecanismos moleculares semejantes para modular la arquitectura de la planta hacia un fenotipo enano de aspecto juvenil, lo que promueve la alimentación de insectos vectores en plantas infectadas y así perpetuar el ciclo de propagación de fitoplasma (Bertaccini et al. 2022).

Aún cuando la infección sistémica con StrPh-CL y la expresión heteróloga del efector

se realizaron en modelos vegetales diferentes, sería posible obtener una idea general del efecto tanto del patógeno como del efector fitopatogénico en el hospedero vegetal. Sin embargo, no podríamos asegurar que se ha restituido el fenotipo infectado mediante la expresión heteróloga de un gen de virulencia; ya que tanto los síntomas la infección del patógeno como su expresión heteróloga son dependientes del hospedero.

Con el fin de poder cumplir, al menos parcialmente, los postulados moleculares de Koch se planea restituir el fenotipo infectivo de StrPh-CL en *A. thaliana* mediante la inoculación mecánica de viriones recombinantes que expresan *sap42_strphCL* obtenidos a partir de material vegetal de *N. benthamiana*; cuya inoculación posee un mayor grado de éxito que la inoculación de genoma viral desnudo. Una vez obtenidas plantas de *A. thaliana* infectadas, se planea realizar un RNA-seq para evaluar los genes diferencialmente expresados (DEGs), con especial énfasis en comprender las posibles correlaciones entre la expresión de SAP42 y los niveles de expresión de TCPs 4, 14, 19, 23; LBD15 y genes claves en la ruta de síntesis/respuesta a auxinas y jasmonatos con el fin de dilucidar los mecanismos moleculares de virulencia del fitoplasma StrPh-CL a través del nuevo efector descrito SAP42_StrPhCL.

8 Conclusiones

- El fitoplasma StrPh-CL del subgrupo ribosomal 16SrXIII-F causa un retraso de desarrollo floral y tejido vegetativo en plantas modelo de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Shahdara.
- El efector homólogo a SAP42 del fitoplasma del grupo 16SrXIII-F cepa StrPh-CL contribuye a la virulencia del patógeno induciendo alteraciones estructurales (incluyendo alteraciones florales) en *Nicotiana benthamiana*.
- En este estudio, no fue posible evaluar la capacidad individual de inducir síntomas en plantas de los genes *tengu_strphCL* y *sap54_strphCL*.
- Estos resultados sugieren que el gen *sap42_strphCL* sería un efector fitopatogénico capaz de inducir síntomas visibles en plantas, y tendría un rol en la virulencia de StrPh-CL, siendo el primer reporte empírico de un homólogo de SAP42 como efector patogénico. Además, es el primer reporte de genes de virulencia codificados en fitoplasmas del grupo ribosomal 16SrXIII, que se encuentran exclusivamente en América.

9 Bibliografía

Aguilar Martinez, J., & Sinha, N. (2013). Analysis of the role of Arabidopsis class I TCP genes AtTCP7, AtTCP8, AtTCP22, and AtTCP23 in leaf development. *Frontiers in Plant Science*, 4. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2013.00406>

Al-Subhi, A. M., Al-Sadi, A. M., Al-Yahyai, R. A., Chen, Y., Mathers, T., Orlovskis, Z., Moro, G., Mugford, S., Al-Hashmi, K. S., & Hogenhout, S. A. (2021). Witches' Broom Disease of Lime Contributes to Phytoplasma Epidemics and Attracts Insect Vectors. *Plant Disease*, 105(9), 2637-2648. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-20-2112-RE>

Am, M., Sugio, A., Makarova O., Findlay, K., Grieve, V., Toth, R., Nicolaisen, M., & Hogenhout, S. (2011). Phytoplasma effector SAP54 induces indeterminate leaf-like flower development in Arabidopsis plants. *Plant Physiology*, 157(2).

Anabestani, A., Izadpanah, K., Abbà, S., Galetto, L., Ghorbani, A., Palmano, S., Siampour, M., Veratti, F., & Marzachì, C. (2017). Identification of putative effector genes and their transcripts in three strains related to '*Candidatus* Phytoplasma aurantifolia'. *Microbiological Research*, 199, 57-66. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.03.001>

Arismendi, N. L., Riegel, R., & Carrillo, R. (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. <https://doi.org/10.1603/EC13167>

Arocha, Y., Horta, D., Piñol, B., Palenzuela, I., Picornell, S., Almeida, R., & Jones, P. (2005). First report of a phytoplasma associated with Bermuda-grass white leaf disease in Cuba. *Plant Pathology*, 54(2), 233-233. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2005.01136.x>

Aurin, M.-B., Haupt, M., Görlach, M., Rümpler, F., & Theißen, G. (2020). Structural Requirements of the Phytoplasma Effector Protein SAP54 for Causing Homeotic Transformation of Floral Organs. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, 33(9), 1129-1141. <https://doi.org/10.1094/MPMI-02-20-0028-R>

Bai, B., Zhang, G., Pei, B., Song, Q., Hao, X., Zhao, L., & Wu, Y. (2023). The function of the phytoplasma effector SWP12 depends on the properties of two key amino acids. *The Journal of Biological Chemistry*, 299(4), 103052. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2023.103052>

Bai, X., Correa, V. R., Toruño, T. Y., Ammar, E.-D., Kamoun, S., & Hogenhout, S. A. (2009). AY-WB phytoplasma secretes a protein that targets plant cell nuclei. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, 22(1), 18-30. <https://doi.org/10.1094/MPMI-22-1-0018>

Bai, X., Zhang, J., Ewing, A., Miller, S. A., Jancso Radek, A., Shevchenko, D. V., Tsukerman, K., Walunas, T., Lapidus, A., Campbell, J. W., & Hogenhout, S. A. (2006). Living with genome instability: The adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts. *Journal of Bacteriology*, 188(10), 3682-3696. <https://doi.org/10.1128/JB.188.10.3682-3696.2006>

Barbara, D. J., Morton, A., Clark, M. F., & Davies, D. L. (2002). Immunodominant membrane proteins from two phytoplasmas in the aster yellows clade (chlorante aster yellows and clover phyllody) are highly divergent in the major hydrophilic region. *Microbiology (Reading, England)*, 148(Pt 1), 157-167. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-1-157>

Bertaccini, A. (2022). Plants and Phytoplasmas: When Bacteria Modify Plants. *Plants*, 11(11).1425 <https://doi.org/10.3390/plants11111425>

Bertaccini, A., Arocha-Rosete, Y., Contaldo, N., Duduk, B., Fiore, N., Montano, H. 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(4). 264-290. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005353>

Bertaccini, A., & DUDUK, B. (2009). Phytoplasma and phytoplasma diseases: A review of recent research. *Phytopathologia Mediterranea*, 48(3), 355-378.

Bertaccini, A., & Lee, I.-M. (2018). Phytoplasmas: An Update. *En Phytoplasmas: Plant Pathogenic Bacteria—I* (pp. 1-29). Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-0119-3_1

Bertaccini, A., Paltrinieri, S., Martini, M., Tedeschi, M., & Contaldo, N. (2013). Micropropagation and Maintenance of Phytoplasmas in Tissue Culture. *En M. Dickinson & J. Hodgetts (Eds.), Phytoplasma: Methods and Protocols* (pp. 33-39). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-089-2_3

Carreón-Anguiano, K. G., Vila-Luna, S. E., Sáenz-Carbonell, L., & Canto-Canché, B. (2023). Novel Insights into Phytoplasma Effectors. *Horticulturae*, 9(11), 1228. <https://doi.org/10.3390/horticulturae9111228>

Carreón-Anguiano, K. G., Vila-Luna, S. E., Sáenz-Carbonell, L., & Canto-Canche, B. (2023). PhyEffector, the First Algorithm That Identifies Classical and Non-Classical Effectors in Phytoplasmas. *Biomimetics*, 8(7), 550. <https://doi.org/10.3390/biomimetics8070550>

Chang, S. H., Tan, C. M., Wu, C.-T., Lin, T.-H., Jiang, S.-Y., Liu, R.-C., Tsai, M.-C., Su, L.-W., & Yang, J.-Y. (2018). Alterations of plant architecture and phase transition by the phytoplasma virulence factor SAP11. *Journal of Experimental Botany*, 69(22), 5389-5401. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery318>

Chen, P., Chen, L., Ye, X., Tan, B., Zheng, X., Cheng, J., Wang, W., Yang, Q., Zhang, Y., Li, J., & Feng, J. (2022). Phytoplasma effector Zaofeng6 induces shoot proliferation by decreasing the expression of ZjTCP7 in *Ziziphus jujuba*. *Horticulture Research*, 9, uhab032. <https://doi.org/10.1093/hr/uhab032>

Cho, S.-T., Kung, H.-J., Huang, W., Hogenhout, S. A., & Kuo, C.-H. (2020). Species Boundaries and Molecular Markers for the Classification of 16SrI Phytoplasmas Inferred by Genome Analysis. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1531. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01531>

Christensen, N. M., Axelsen, K. B., Nicolaisen, M., & Schulz, A. (2005). Phytoplasmas and their interactions with hosts. *Trends in Plant Science*, 10(11), 526-535. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.09.008>

Contaldo, N., Bertaccini, A., Paltonieri, S., M.Windsor, H., & Windsor, G. D. (2012). Axenic culture of plant pathogenic phytoplasmas. *Phytopathologia Mediterranea*, 51(3), 607-617.

Contaldo, N., Satta, E., Zambon, Y., Paltrinieri, S., & Bertaccini, A. (2016a). Development and evaluation of different complex media for phytoplasma isolation and growth. *Journal of Microbiological Methods*, 127, 105-110. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.05.031>

Correa Marrero, M., Capdevielle, S., Huang, W., Al-Subhi, A. M., Busscher, M., Busscher-Lange, J., van der Wal, F., de Ridder, D., van Dijk, A. D. J., Hogenhout, S. A., & Immink, R. G. H. (2024). Protein interaction mapping reveals widespread targeting of development-related host transcription factors by phytoplasma effectors. *The Plant Journal*, 117(4), 1281–1297. <https://doi.org/10.1111/tpj.16546>

Cubas, P., Lauter, N., Doebley, J., & Coen, E. (1999). The TCP domain: A motif found in proteins regulating plant growth and development. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 18(2), 215-222. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1999.00444.x>

Cui, W., Fiore, N., & Zamorano, A. (2022). Draft Genome Sequence Resource of ‘*Fragaria × ananassa*’ Phyllody Phytoplasma Strain StrPh-CL from Chilean Strawberry. *Plant Disease*, 106(3), 1031-1034. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-21-1959-A>

Cui, W., Quiroga Barrera, N., Curkovic, S., Zamorano, A., & Fiore, N. (2019). Detection and identification of 16SrXIII-F and a novel 16SrXIII phytoplasma subgroups associated with strawberry phyllody in Chile. *European Journal of Plant Pathology*, Volume 155, pp 1039–1046 <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01808-w>

Danisman, S., van Dijk, A. D. J., Bimbo, A., van der Wal, F., Hennig, L., de Folter, S., Angenent, G. C., & Immink, R. G. H. (2013). Analysis of functional redundancies within the *Arabidopsis* TCP transcription factor family. *Journal of Experimental Botany*, 64(18), 5673-5685. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert337>

Davis, R. E., Harrison, N. A., Zhao, Y., Wei, W., & Dally, E. L. (2016). «*Candidatus* Phytoplasma hispanicum», a novel taxon associated with Mexican periwinkle virescence disease of *Catharanthus roseus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(9), 3463-3467. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001218>

Davis, R. E., Zhao, Y., Dally, E. L., Jomantiene, R., Lee, I.-M., Wei, W., & Kitajima, E. W. (2012). «*Candidatus* Phytoplasma sudamericanum», a novel taxon, and strain PassWB-Br4, a new subgroup 16SrIII-V phytoplasma, from diseased passion fruit (*Pasiflora edulis* f. *Flavicarpa* Deg.). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(Pt 4), 984-989. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.033423-0>

Debonneville, C., Mandelli, L., Brodard, J., Groux, R., Roquis, D., & Schumpp, O. (2022). The Complete Genome of the «Flavescence Dorée» Phytoplasma Reveals Characteristics of Low Genome Plasticity. *Biology*, 11(7), 953.

Deng, S., & Hiruki, C. (1991). Amplification of 16S rRNA genes from culturable and nonculturable Mollicutes. *Journal of Microbiological Methods*, 14(1), 53-61.

Dickinson, M. (2010). Mobile units of DNA in phytoplasma genomes. *Molecular Microbiology*, 77(6), 1351-1353. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07308.x>

Fan, D., Ran, L., Hu, J., Ye, X., Xu, D., Li, J., Su, H., Wang, X., Ren, S., & Luo, K. (2020). miR319a/TCP module and DELLA protein regulate trichome initiation synergistically and improve insect defenses in *Populus tomentosa*. *New Phytologist*, 227(3), 867-883. <https://doi.org/10.1111/nph.16585>

Facundo R., Quiroga, N., Méndez P., Zamorano, A. and Fiore, N. First Report of ‘*Candidatus Phytoplasma pyri*’ on Pear in Chile. (2017). *Plant Disease*. 98(7):989. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-16-1144-PDN>

Fernández, F. D., Yan, X.-H., Kuo, C.-H., Marcone, C., & Conci, L. R. (2024). Improving the Comprehension of Pathogenicity and Phylogeny in ‘*Candidatus Phytoplasma meliae*’ through Genome Characterization. *Microorganisms*, 12(1):142. doi: 10.3390/microorganisms12010142.

Fernandez, F., Debat, H., & Conci, L. (2018). Molecular characterization of effector protein SAP54 in Bellis Virescence Phytoplasma (16SrIII-J). <https://doi.org/10.1101/411140>

Ferrero, L. V., Gastaldi, V., Ariel, F. D., Viola, I. L., & Gonzalez, D. H. (2021). Class I TCP proteins TCP14 and TCP15 are required for elongation and gene expression responses to auxin. *Plant Molecular Biology*, 105(1), 147-159. <https://doi.org/10.1007/s11103-020-01075-y>

Fiore, N., Zamorano, A., & Pino, A. M. (2015). Identification of phytoplasmas belonging to the ribosomal groups 16SrIII and 16SrV in Chilean grapevines. *Phytopathogenic Mollicutes*, 5(1), 32. <https://doi.org/10.5958/2249-4677.2015.00060.2>

Firrao, G., Martini, M., Ermacora, P., Loi, N., Torelli, E., Foissac, X., Carle, P., Kirkpatrick, B. C., Liefting, L., Schneider, B., Marzachi, C., & Palmano, S. (2013). Genome wide sequence analysis grants unbiased definition of species boundaries in «*Candidatus Phytoplasma*». *Systematic and Applied Microbiology*, 36(8), 539-548.

Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., & Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3(5), 294-299.

Galetto, L., Bosco, D., Balestrini, R., Genre, A., Fletcher, J., & Marzachi, C. (2011). The Major Antigenic Membrane Protein of “*Candidatus Phytoplasma asteris*” Selectively Interacts with ATP Synthase and Actin of Leafhopper Vectors. *PLOS ONE*, 6(7), e22571. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022571>

Gao, X., Ren, Z., Zhao, W., & Li, W. (2023). *Candidatus Phytoplasma ziziphi* encodes non-classically secreted proteins that suppress hypersensitive cell death response in *Nicotiana benthamiana*. *Phytopathology Research*, 5(1), 11. <https://doi.org/10.1186/s42483-023-00166-0>

Garcion, C., Béven, L., & Foissac, X. (2021). Comparison of Current Methods for Signal Peptide Prediction in Phytoplasmas. *Frontiers in Microbiology*, 12, 661524. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.661524>

Gasparich, G. E. (2010). Spiroplasmas and phytoplasmas: Microbes associated with plant hosts. *Biologicals: Journal of the International Association of Biological Standardization*, 38(2), 193-203. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2009.11.007>

Giraud, E., Ng, S., Carrie, C., Duncan, O., Low, J., Lee, C. P., Van Aken, O., Millar, A. H., Murcha, M., & Whelan, J. (2010). TCP transcription factors link the regulation of genes encoding mitochondrial proteins with the circadian clock in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, 22(12), 3921-3934. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.074518>

Golem, S., & Culver, J. N. (2003). Tobacco mosaic virus Induced Alterations in the Gene Expression Profile of *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 16(8), 681-688. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2003.16.8.681>

González, F., Zamorano, A., Pino, A. M., Paltrinieri, S., Bertaccini, A., & Fiore, N. (2011). Identification of phytoplasma belonging to X-disease group in cherry in Chile. *Bulletin of Insectology*. <http://www.bulletinofinsectology.org/pdfarticles/vol64-2011-S235-S236gonzalez.pdf>

Gourret, J. P., Maillet, P. L., & Gouranton, J. (1973). Virus-like particles associated with the mycoplasmas of clover phyllody in the plant and in the insect vector. *Journal of General Microbiology*, 74(2), 241-249. <https://doi.org/10.1099/00221287-74-2-241>

Gregis, V., Andrés, F., Sessa, A., Guerra, R. F., Simonini, S., Mateos, J. L., Torti, S., Zambelli, F., Prazzoli, G. M., Bjerkan, K. N., Grini, P. E., Pavesi, G., Colombo, L., Coupland, G., & Kater, M. M. (2013). Identification of pathways directly regulated by SHORT VEGETATIVE PHASE during vegetative and reproductive development in *Arabidopsis*. *Genome Biology*, 14(6), R56. <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-6-r56>

Gundersen, D. E., & Lee, I.-M. (1996). Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathologia Mediterranea*, 35(3), 144-151.

Hogenhout, S. A., Oshima, K., Ammar, E.-D., Kakizawa, S., Kingdom, H. N., & Namba, S. (2008). Phytoplasmas: Bacteria that manipulate plants and insects. *Molecular Plant Pathology*, 9(4), 403-423. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2008.00472.x>

Hoshi, A., Oshima, K., Kakizawa, S., Ishii, Y., Ozeki, J., Hashimoto, M., Komatsu, K., Kagiwada, S., Yamaji, Y., & Namba, S. (2009). A unique virulence factor for proliferation and dwarfism in plants identified from a phytopathogenic bacterium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(15), 6416-6421.

Huang, W., & Hogenhout, S. A. (2022). Interfering with plant developmental timing promotes susceptibility to insect vectors of a bacterial parasite (p. 2022.03.30.486463). *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2022.03.30.486463>

Huang, W., MacLean, A. M., Sugio, A., Maqbool, A., Busscher, M., Cho, S.-T., Kamoun, S., Kuo, C.-H., Immink, R. G. H., & Hogenhout, S. A. (2021). Parasitic modulation of host development by ubiquitin-independent protein degradation. *Cell*, 184(20), 5201-5214.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.08.029>

Huang, W., Reyes-Caldas, P., Mann, M., Seifbarghi, S., Kahn, A., Almeida, R. P. P., Béven, L., Heck, M., Hogenhout, S. A., & Coaker, G. (2020). Bacterial Vector-Borne Plant Diseases: Unanswered Questions and Future Directions. *Molecular Plant*, 13(10), 1379-1393. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2020.08.010>

Im, L., Kd, B.-P., Y, Z., Re, D., & Na, H. (2010). Phylogenetic analysis and delimitation of phytoplasmas based on *secY* gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(Pt 12). <https://doi.org/10.1099/ijs.0.019695-0>

Iwabuchi, N., Kitazawa, Y., Maejima, K., Koinuma, H., Miyazaki, A., Matsumoto, O., Suzuki, T., Nijo, T., Oshima, K., Namba, S., & Yamaji, Y. (2020). Functional variation in phyllogen, a phyllody-inducing phytoplasma effector family, attributable to a single amino acid polymorphism. *Molecular Plant Pathology*, 21(10), 1322-1336.

Jomantiene, R., Zhao, Y., & Davis, R. E. (2007). Sequence-variable mosaics: Composites of recurrent transposition characterizing the genomes of phylogenetically diverse phytoplasmas. *DNA and Cell Biology*, 26(8), 557-564. <https://doi.org/10.1089/dna.2007.0610>

Kakizawa, S., Oshima, K., & Namba, S. (2006). Diversity and functional importance of phytoplasma membrane proteins. *Trends in Microbiology*, 14(6), 254-256.

Kakizawa, S., Oshima, K., Nishigawa, H., Jung, H.-Y., Wei, W., Suzuki, S., Tanaka, M., Miyata, S.-I., Ugaki, M., & Namba, S. (2004). Secretion of immunodominant membrane protein from onion yellows phytoplasma through the Sec protein-translocation system in *Escherichia coli*. *Microbiology (Reading, England)*, 150(Pt 1), 135-142.

Kaufmann, K., Wellmer, F., Muiño, J. M., Ferrier, T., Wuest, S. E., Kumar, V., Serrano-Mislata, A., Madueño, F., Krajewski, P., Meyerowitz, E. M., Angenent, G. C., & Riechmann, J. L. (2010). Orchestration of floral initiation by APETALA1. *Science (New York, N.Y.)*, 328(5974), 85-89. <https://doi.org/10.1126/science.1185244>

Kieffer, M., Master, V., Waites, R., & Davies, B. (2011). TCP14 and TCP15 affect internode length and leaf shape in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 68(1), 147-158. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04674.x>

Koinuma, H., Maejima, K., Tokuda, R., Kitazawa, Y., Nijo, T., Wei, W., Kumita, K., Miyazaki, A., Namba, S., & Yamaji, Y. (2020). Spatiotemporal dynamics and quantitative analysis of phytoplasmas in insect vectors. *Scientific Reports*, 10(1), 4291.

Kube, M., Mitrovic, J., Duduk, B., Rabus, R., & Seemüller, E. (2012). Current view on phytoplasma genomes and encoded metabolism. *TheScientificWorldJournal*, 2012, 185942. doi: 10.1100/2012/185942

Kumari, S., Nagendran, K., Rai, A. B., Singh, B., Rao, G. P., & Bertaccini, A. (2019). Global Status of Phytoplasma Diseases in Vegetable Crops. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1349. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01349>

Lee, I.-M., Polashock, J., Bottner-Parker, K. D., Bagadia, P. G., Rodriguez-Saona, C., Zhao, Y., & Davis, R. E. (2014). New subgroup 16SrIII-Y phytoplasmas associated with false-blossom diseased cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) plants and with known and potential insect vectors in New Jersey. *European Journal of Plant Pathology*, 139(2), 399-406. <https://doi.org/10.1007/s10658-014-0396-7>

Liu, C., Xi, W., Shen, L., Tan, C., & Yu, H. (2009). Regulation of floral patterning by flowering time genes. *Developmental Cell*, 16(5), 711-722.

Lu, Y.-T., Cheng, K.-T., Jiang, S.-Y., & Yang, J.-Y. (2014). Post-translational cleavage and self-interaction of the phytoplasma effector SAP11. *Plant Signaling & Behavior*, 9.

Lu, Y.-T., Li, M.-Y., Cheng, K.-T., Tan, C. M., Su, L.-W., Lin, W.-Y., Shih, H.-T., Chiou, T.-J., & Yang, J.-Y. (2014). Transgenic plants that express the phytoplasma effector SAP11 show altered phosphate starvation and defense responses. *Plant Physiology*, 164(3), 1456-1469. <https://doi.org/10.1104/pp.113.229740>

Luo, D., Carpenter, R., Copsey, L., Vincent, C., Clark, J., & Coen, E. (1999). Control of organ asymmetry in flowers of *Antirrhinum*. *Cell*, 99(4), 367-376. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81523-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81523-8)

Luo, D., Carpenter, R., Vincent, C., Copsey, L., & Coen, E. (1996). Origin of floral asymmetry in *Antirrhinum*. *Nature*, 383(6603), 794-799. <https://doi.org/10.1038/383794a0>

MacLean, A. M., Orlovskis, Z., Kowitwanich, K., Zdziarska, A. M., Angenent, G. C., Immink, R. G. H., & Hogenhout, S. A. (2014). Phytoplasma effector SAP54 hijacks plant reproduction by degrading MADS-box proteins and promotes insect colonization in a RAD23-dependent manner. *PLoS Biology*, 12(4), e1001835.

MacLean, A. M., Sugio, A., Makarova, O. V., Findlay, K. C., Grieve, V. M., Tóth, R., Nicolaisen, M., & Hogenhout, S. A. (2011). Phytoplasma effector SAP54 induces indeterminate leaf-like flower development in Arabidopsis plants. *Plant Physiology*, 157(2), 831-841. <https://doi.org/10.1104/pp.111.181586>

Madariaga, M., Ramírez, I., Madariaga, M., & Ramírez, I. (2019). Identification of a phytoplasma associated with witches' broom symptoms in calafate (*Berberis microphylla* G. Forst.). *Chilean journal of agricultural research*, 79(3), 493-498. <https://doi.org/10.4067/S0718-58392019000300493>

Maejima, K., Iwai, R., Himeno, M., Komatsu, K., Kitazawa, Y., Fujita, N., Ishikawa, K., Fukuoka, M., Minato, N., Yamaji, Y., Oshima, K., & Namba, S. (2014). Recognition of floral homeotic MADS domain transcription factors by a phytoplasmal effector, phyllogen, induces phyllody. *The Plant Journal*, 78(4), 541-554. <https://doi.org/10.1111/tpj.12495>

Maejima, K., Kitazawa, Y., Tomomitsu, T., Yusa, A., Neriya, Y., Himeno, M., Yamaji, Y., Oshima, K., & Namba, S. (2015). Degradation of class E MADS-domain transcription factors in *Arabidopsis* by a phytoplasmal effector, phyllogen. *Plant Signaling & Behavior*, 10(8), e1042635. <https://doi.org/10.1080/15592324.2015.1042635>

Marcone, C., Neimark, H., Ragozzino, A., Lauer, U., & Seemüller, E. (2007). Chromosome Sizes of Phytoplasmas Composing Major Phylogenetic Groups and Subgroups. *The American Phytopathological Society*. Vol 89, issue 9, pages 805-810. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1999.89.9.805>

Minato, N., Himeno, M., Hoshi, A., Maejima, K., Komatsu, K., Takebayashi, Y., Kasahara, H., Yusa, A., Yamaji, Y., Oshima, K., Kamiya, Y., & Namba, S. (2014). The phytoplasmal virulence factor TENGU causes plant sterility by downregulating of the jasmonic acid and auxin pathways. *Scientific Reports*, 4,7399. <https://doi.org/10.1038/srep07399>

Morris, S. E., Cox, M. C. H., Ross, J. J., Krisantini, S., & Beveridge, C. A. (2005). Auxin dynamics after decapitation are not correlated with the initial growth of axillary buds. *Plant Physiology*, 138(3), 1665-1672. <https://doi.org/10.1104/pp.104.058743>

Moya-Raygoza, G., & Nault, L. R. (1998). Transmission Biology of Maize Bushy Stunt Phytoplasma by the Corn Leafhopper (Homoptera: Cicadellidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 91(5), 668-676. <https://doi.org/10.1093/aesa/91.5.668>

Murrall, D. J., Nault, L. R., Hoy, C. W., Madden, L. V., & Miller, S. A. (1996). Effects of Temperature and Vector Age on Transmission of Two Ohio Strains of Aster Yellows Phytoplasma by the Aster Leafhopper (Homoptera: Cicadellidae). *Journal of Economic Entomology*, 89(5), 1223-1232. <https://doi.org/10.1093/jee/89.5.1223>

Nagpal, P., Ellis, C. M., Weber, H., Ploense, S. E., Barkawi, L. S., Guilfoyle, T. J., Hagen, G., Alonso, J. M., Cohen, J. D., Farmer, E. E., Ecker, J. R., & Reed, J.

W. (2005). Auxin response factors ARF6 and ARF8 promote jasmonic acid production and flower maturation. *Development (Cambridge, England)*, 132(18), 4107-4118. <https://doi.org/10.1242/dev.01955>

Nakajima, S., Nishimura, N., Jung, H., Kakizawa, S., Fujisawa, I., Namba, S., & Tsuchizaki, T. (2009). Movement of onion yellows phytoplasma and *Cryptotaenia japonica* witches' broom phytoplasma in the nonvector insect *Nephotettix cincticeps*. *Japanese Journal of Phytopathology*, 64: 474-477

Namba, S. (2019). Molecular and biological properties of phytoplasmas. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences*, 95(7), 401-418. <https://doi.org/10.2183/pjab.95.028>

Orlovskis, Z., & Hogenhout, S. A. (2016). A Bacterial Parasite Effector Mediates Insect Vector Attraction in Host Plants Independently of Developmental Changes. *Frontiers in Plant Science*, 7, 885. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00885>

Oshima, K., Ishii, Y., Kakizawa, S., Sugawara, K., Neriya, Y., Himeno, M., Minato, N., Miura, C., Shiraiishi, T., Yamaji, Y., & Namba, S. (2011). Dramatic transcriptional changes in an intracellular parasite enable host switching between plant and insect. *PLoS One*, 6(8), e23242. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023242>

Oshima, K., Kakizawa, S., Nishigawa, H., Jung, H.-Y., Wei, W., Suzuki, S., Arashida, R., Nakata, D., Miyata, S., Ugaki, M., & Namba, S. (2004). Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of a plant-pathogenic phytoplasma. *Nature Genetics*, 36(1), 27-29. <https://doi.org/10.1038/ng1277>

Pacifico, D., Galetto, L., Rashidi, M., Abbà, S., Palmano, S., Firrao, G., Bosco, D., & Marzachi, C. (2015). Decreasing global transcript levels over time suggest that phytoplasma cells enter stationary phase during plant and insect colonization. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(7), 2591-2602. <https://doi.org/10.1128/AEM.03096-14>

Pecher, P., Moro, G., Canale, M. C., Capdevielle, S., Singh, A., MacLean, A., Sugio, A., Kuo, C.-H., Lopes, J. R. S., & Hogenhout, S. A. (2019). Phytoplasma SAP11 effector destabilization of TCP transcription factors differentially impact development and defence of *Arabidopsis* versus maize. *PLoS Pathogens*, 15(9), e1008035.

Pérez-López, E., & Dumonceaux, T. J. (2016). Detection and identification of the heterogeneous novel subgroup 16SrXIII-(A/I)I phytoplasma associated with strawberry green petal disease and Mexican periwinkle virescence. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(11), 4406-4415. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001365>

- Pérez-López, E., Luna-Rodríguez, M., Olivier, C. Y., & Dumonceaux, T. J. (2016). The underestimated diversity of phytoplasmas in Latin America. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(1), 492-513. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000726>
- Pruneda-Paz, J. L., Breton, G., Para, A., & Kay, S. A. (2009). A functional genomics approach reveals CHE as a component of the *Arabidopsis* circadian clock. *Science (New York, N.Y.)*, 323(5920), 1481-1485. <https://doi.org/10.1126/science.1167206>
- Quiroga, N., Gamboa, C., Medina, G., Contaldo, N., Torres, F., Bertaccini, A., Zamorano, A., & Fiore, N. (2021). Survey for «*Candidatus Liberibacter*» and «*Candidatus Phytoplasma*» in Citrus in Chile. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 11(1), 48.
- Ramos, A., Esteves, M. B., Cortés, M. T. B., & Lopes, J. R. S. (2020). Maize Bushy Stunt Phytoplasma Favors Its Spread by Changing Host Preference of the Insect Vector. *Insects*, 11(9), 600. <https://doi.org/10.3390/insects11090600>
- Rashidi, M., Galetto, L., Bosco, D., Bulgarelli, A., Vallino, M., Veratti, F., & Marzachi, C. (2015). Role of the major antigenic membrane protein in phytoplasma transmission by two insect vector species. *BMC Microbiology*, 15, 193. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0522-5>
- Sarvepalli, K., & Nath, U. (2011). Hyper-activation of the TCP4 transcription factor in *Arabidopsis thaliana* accelerates multiple aspects of plant maturation. *The Plant Journal*, 67(4), 595-607. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04616.x>
- Schneider, B., & Gibb, K. S. (1997). Sequence and RFLP analysis of the elongation factor Tu gene used in differentiation and classification of phytoplasmas. *Microbiology (Reading, England)*, 143 (Pt 10), 3381-3389. <https://doi.org/10.1099/00221287-143-10-3381>
- Schneider, B., Kätzel, R., & Kube, M. (2020). Widespread occurrence of «*Candidatus Phytoplasma ulmi*» in elm species in Germany. *BMC Microbiology*, 20(1), 74. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01749-z>
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 7-14 . <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Schommer, C., Palatnik, J. F., Aggarwal, P., Chételat, A., Cubas, P., Farmer, E. E., Nath, U., & Weigel, D. (2008). Control of Jasmonate Biosynthesis and Senescence by miR319 Targets. *PLOS Biology*, 6(9), e230. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060230>

Singh, A., & Lakhanpaul, S. (2020). Detection, characterization and evolutionary aspects of S54LP of SP (SAP54 Like Protein of Sesame Phyllody): A phytoplasma effector molecule associated with phyllody development in sesame (*Sesamum indicum* L.). *Physiology and Molecular Biology of Plants: An International Journal of Functional Plant Biology*, 26(3), 445-458. <https://doi.org/10.1007/s12298-020-00764-8>

Smart, C. D., Schneider, B., Blomquist, C. L., Guerra, L. J., Harrison, N. A., Ahrens, U., Lorenz, K. H., Seemüller, E., & Kirkpatrick, B. C. (1996). Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of the 16S-23S rRNA spacer region. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(8), 2988-2993.

Strohmayr, A., Schwarz, T., Braun, M., Krczal, G., & Boonrod, K. (2021). The Effect of the Anticipated Nuclear Localization Sequence of «*Candidatus* Phytoplasma mali» SAP11-like Protein on Localization of the Protein and Destabilization of TCP Transcription Factor. *Microorganisms*, 9(8), 1756. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081756>

Sugawara, K., Honma, Y., Komatsu, K., Himeno, M., Oshima, K., & Namba, S. (2013). The Alteration of Plant Morphology by Small Peptides Released from the Proteolytic Processing of the Bacterial Peptide TENGU1[W]. *Plant Physiology*, 162(4), 2005-2014. <https://doi.org/10.1104/pp.113.218586>

Sugio, A., Kingdom, H. N., MacLean, A. M., Grieve, V. M., & Hogenhout, S. A. (2011). Phytoplasma protein effector SAP11 enhances insect vector reproduction by manipulating plant development and defense hormone biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(48), E1254-1263. <https://doi.org/10.1073/pnas.1105664108>

Suzuki, S., Oshima, K., Kakizawa, S., Arashida, R., Jung, H.-Y., Yamaji, Y., Nishigawa, H., Ugaki, M., & Namba, S. (2006). Interaction between the membrane protein of a pathogen and insect microfilament complex determines insect-vector specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(11), 4252-4257. <https://doi.org/10.1073/pnas.0508668103>

Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), 3022-3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>

Tan, C. M., Lin, Y.-C., Li, J.-R., Chien, Y.-Y., Wang, C.-J., Chou, L., Wang, C.-W., Chiu, Y.-C., Kuo, C.-H., & Yang, J.-Y. (2021). Accelerating Complete Phytoplasma Genome Assembly by Immunoprecipitation-Based Enrichment and MinION-Based DNA Sequencing for Comparative Analyses. *Frontiers in Microbiology*, 12, 766221.

Timpte, C., Wilson, A. K., & Estelle, M. (1994). The *axr2-1* mutation of *Arabidopsis thaliana* is a gain-of-function mutation that disrupts an early step in auxin response. *Genetics*, 138(4), 1239-1249. <https://doi.org/10.1093/genetics/138.4.1239>

Toruño, T. Y., Seruga Musić, M., Simi, S., Nicolaisen, M., & Hogenhout, S. A. (2010). Phytoplasma PMU1 exists as linear chromosomal and circular extrachromosomal elements and has enhanced expression in insect vectors compared with plant hosts. *Molecular Microbiology*, 77(6), 1406-1415. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07296.x>

Trivellone, V., & Dietrich, C. H. (2021). Evolutionary Diversification in Insect Vector–Phytoplasma–Plant Associations. *Annals of the Entomological Society of America*, 114(2), 137-150.

Trivellone, V., Ripamonti, M., Angelini, E., Filippin, L., Rossi, M., Marzachi, C., & Galetto, L. (2019). Evidence suggesting interactions between immunodominant membrane protein Imp of Flavescence dorée phytoplasma and protein extracts from distantly related insect species. *Journal of Applied Microbiology*, 127(6), 1801-1813.

Wang, N., Yang, H., Yin, Z., Liu, W., Sun, L., & Wu, Y. (2018). Phytoplasma effector SWP1 induces witches' broom symptom by destabilizing the TCP transcription factor BRANCHED1. *Molecular Plant Pathology*, 19(12), 2623-2634.

Wang, Q., Guo, Y., Wang, N., Li, Y., Chen, W., Chen, W., & Wu, Y. (2014). Identification of a Conserved Core Genome with Group-Specific Genes from Comparative Genomics of Ten Different *Candidatus* Phytoplasma Strains. *Journal of Phytopathology*, 162(10), 650-659. <https://doi.org/10.1111/jph.12239>

Wei, W., Davis, R. E., Jomantiene, R., & Zhao, Y. (2008). Ancient, recurrent phage attacks and recombination shaped dynamic sequence-variable mosaics at the root of phytoplasma genome evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(33), 11827-11832. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805237105>

Wei, W., Kakizawa, S., Suzuki, S., Jung, H.-Y., Nishigawa, H., Miyata, S.-I., Oshima, K., Ugaki, M., Hibi, T., & Namba, S. (2004). In planta dynamic analysis of onion yellows phytoplasma using localized inoculation by insect transmission. *Phytopathology*, 94(3), 244-250. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2004.94.3.244>

Wei, W., Lee, I.-M., Davis, R. E., Suo, X., & Zhao, Y. (2008). Automated RFLP pattern comparison and similarity coefficient calculation for rapid delineation of new and distinct phytoplasma 16Sr subgroup lineages. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(Pt 10), 2368-2377. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65868-0>

Weintraub, P. G., & Beanland, L. (2006). Insect Vectors of Phytoplasmas. *Annual Review of Entomology*, 51(1), 91-111. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.151039>

Weisburg, W. G., Tully, J. G., Rose, D. L., Petzel, J. P., Oyaizu, H., Yang, D., Mandelco, L., Sechrest, J., Lawrence, T. G., & Van Etten, J. (1989). A phylogenetic analysis of the mycoplasmas: Basis for their classification. *Journal of Bacteriology*, 171(12), 6455-6467. <https://doi.org/10.1128/jb.171.12.6455-6467.1989>

Xu, F., Dong, H., Guo, W., Le, L., Jing, Y., Fletcher, J. C., Sun, J., & Pu, L. (2024). The *trxG* protein *ULT1* regulates *Arabidopsis* organ size by interacting with *TCP14/15* to antagonize the LIM-peptidase *DA1* for H3K4 trimethylation on target genes. *Plant Communications*, Vol 5(4) 100819. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2024.100819>

Zhao, Y., & 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. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000999>

Zhao, Y., Wei, W., Lee, I.-M., Shao, J., Suo, X., & Davis, R. E. (2009). Construction of an interactive online phytoplasma classification tool, *iPhyClassifier*, and its application in analysis of the peach X-disease phytoplasma group (16SrIII). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(Pt 10), 2582-2593.

Zheng, X., Lan, J., Yu, H., Zhang, J., Zhang, Y., Qin, Y., Su, X.-D., & Qin, G. (2022). *Arabidopsis* transcription factor *TCP4* represses chlorophyll biosynthesis to prevent petal greening. *Plant Communications*, 3(4), 100309. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2022.100309>

A Secuencias nucleotídicas de clones recombinantes de *E. coli* TOP10 transformados con vectores pBSG1057

A.1 pBSG1057-*sap54*

sap54-full

```
ATGTTTCGATCAAAAAACCAATTTAAAAATAATTCATCTTTGTTTAATCACTTTTATAGGATTATTATTTA
TTTTTAATAATCATCAAGTAATGGCGATGAATAATAATGAAGCTGGCCCAAGCAATAATCCATCAATTGA
AGAAATGATTATTGATACAAAAAATAAAATTCGCGATAATGCAAATAAAAAAGTTAATATAGAAAAAGAA
ATATCACAAAGAAAGAAATAATCAAATAATCTTCAAAAAATTGAAAATCTTACTCAAATATCAAATAATT
TAACATTATTAATTAATAATCAAAAAAGAACAACTAAAAACCTATAAAACACTTTTAAATATTTTAAATGA
TTAA
```

SAP54_TMV_1

```
CTTTTTTGGCGGGGGGGCCTTTGGTTGCCCTCTTTTTTTTTGGGGGGGGCGGGGGTTTTTTGTTTTGGGG
TTTTTTCGTAAATAGATCTTACAGTATCACTACTCCATCTCAGTTCGTGTTCTTGTCAATTAATTAATG
TTTCGATCAAAAAACCAATTTAAAAATAATTCATCTTTGTTTAATCACTTTTATAGGATTATTATTTATTT
TTAATAATCATCAAGTAATGGCGATGAATAATAATGAAGCTGGCCCAAGCAATAATCCATCAATTGAAGA
AATGATTATTGATACAAAAAATAAAATTCGCGATAATGCAAATAAAAAAGTTAATATAGAAAAAGAAATA
TCACAAGAAAGAAATAATCAAATAATCTTCAAAAAATTGAAAATCTTACTCAAATATCAAATAATTTAA
CATTATTAATTAATAATCAAAAAAGAACAACTAAAAACCTATAAAACACTTTTAAATATTTTAAATGATTA
```

ACTCGAGGGGTAGTCAAGATGCATAATAAATAACGGATTGTGTCCGTAATCACACGTGGTGCGTACGATA
ACGCATATAGTATTTTTCCCCCTAATAGAATACGGACCAACTAAGTAATACGTGATGTCCGTATGGCATT
GGCCGGTGCGTTAGTTATAGTTCCATCG

SAP54_TMV_2

TAGAGACTCCTCTCCCTCTTAGTTCGTGTTCTTGTCAATTAATTTAAATGTTTCGATCAAAAAACCAATT
TAAAATAATTCATCTTTGTTTAACTTTTATAGGATTATTATTTATTTTAAATAATCATCAAGTAATG
GCGATGAATAATAATGAAGCTGGCCCAAGCAATAATCCATCAATTGAAGAAATGATTATTGATACAAAA
ATAAAATTCGCGATAATGCAAATAAAAAAGTTAATATAGAAAAAGAAATATCACAAGAAAGAAATAATCA
AAATAATCTTCAAAAAATTGAAAACTTACTCAAATATCAAATAATTTAACATTATTAATTAATAATCAA
AAAGAACAATAAAAACTATAAAACACTTTTAAATATTTTAAATGATTAACGAGGGGTAGTCAAGAT
GCATAATAAATAACGGATTGTGTCCGTAATCACACGTGGTGCGTACGATAACGCAATAGTTTTTTTCCCC
CAATAGGGGAAAGCGGAAGCATTGGTCTTTATGTGACTTACTTTGTTTAAATGCATGATTATCACCAAGC
TGTTTCTATGAGTTGATAGGAACCTTCTAAATCACCCACTACTCCTGCATCAGC

SAP54_TMV_3

GGCGGGGGGCCTTTTAGTTCGTGTTCTTGTATGTTTCGATCAAAAAACCAATTTAAAATAATTCATCTT
TGTTTAACTACTTTTATAGGATTATTATTTATTTTAAATAATCATCAAGTAATGGCGATGAATAATAATG
AAGCTGGCCCAAGCAATAATCCATCAATTGAAGAAATGATTATTGATACAAAAATAAAATTCGCGATAA
TGCAAATAAAAAAGTTAATATAGAAAAAGAAATATCACAAGAAAGAAATAATCAAAAATAATCTTCAAAAA
ATTGAAAATCTTACTCAAATATCAAATAATTTAACATTATTAATTAATAATCAAAAAAGAACAATAAAAA
CCTATAAAACACTTTTAAATATTTTAAATGATTAACGAGAGGAACCTTCTAAATCACCCACTACTCCT
GCATCAGCTAGTTATAGTTCCATCG

A.2 pBSG1057-tengu A

tengu_A

ATGGTAAAAAATAAAAAATCATATTATCATTTTGTATATTATTAGGGTTTTTATTTATTTTCTTTTTGGTA
AGCATCATGTTATTTTGCTTCTGAACAAGACGAAGATATGAAAAACAATAACTTCAATTTTAAATAA
AAAAATCAAACAATGAAATCGAATATAAATGCGAACAGATGTTAAAAACATGCAAGAAATTAAGAT
AAATTGAAAAATATGGCAACAACACTCATAAAAAGCAATATTAATAATTTAAATGAAGAAGATCAAAAA
TTGTAAACGGGCGACAAAGAGGCCAAATTATCGAGTAA-----

ATL52_2520_A_Pf_TMV

TGGGTAAAAAATAAAAATCATATTATCATTTTTGATATTATTAGGGTTTTTATTTATTTTTCTTTTTGGTA
AGCATCATGTTATTTTTGCTTCTGAACAAGACGAA-ATATGGAAAAACAATAACTTCAATTTTAAATAA
AAAAAATCAAACAAATGAAATCGAATATAAATGCGAACAGATGTTAAAAAACATGCAAGAAATTAAGAT
AAATTGAAAAATATGGCAACAACCTCATCAAAAAGCAATATTAAAAAATTTAAATGAAGAAGATCAAAAAA
TTGTAAACGGGCGACAAAGAGGCCAAATTATCGAGTAACTCGAGGGGTAGTCAAGATGCATAA

ATL52_2520_A_Pr_TMV

T-GGTAAAAAATAAAAATCATATTATCATTTTTGATATTATTAGGGTTTTTATTTATTTTTCTTTTTGGTA
AGCATCATGTTATTTTTGCTTCTGAACAAGACGAAGATATGGAAAAACAATAACTTCAATTTTAAATAA
AAAAAATCAAACAAATGAAATCGAA-ATAAATGCGAACAGATGTTAAAAAACATGCAAGAAATTAAGAT
AAATTGAAAAATATGGCAACAACCTCATCAAAAAGCAATATTAAAAAATTTAAATGAAGAAGATCAAAAAA
TTGTAAACGGGCGACAAAGAGGCCAAATTATCGAGTA-CTCGAGGGGTAGTCAAGATGCATAA

ATL52_2520_B_Pf_TMV

TGGGTAAAAAATAAAAATCATATTATCATTTTTGATATTATTAGGGTTTTTATTTATTTTTCTTTTTGGTA
AGCATCATGTTATTTTTGCTTCTGAACAAGACGAAGATATGGAAAAACAATAACTTCAATTTTAAATAA
AAAAAATCAAACAAATGAAATCGAATATAAATGCGAACAGATGTTAAAAAACATGCAAGAAATTAAGAT
AAATTGAAAAATATGGCAACAACCTCATCAAAAAGCAATATTAAAAAATTTAAATGAAGAAGATCAAAAAA
TTGTAAACGGGCGACAAAGAGGCCAAATTATCGAGTAACTCGAGGGGTAGTCAAGATGCATAA

ATL52_2520_B_Pr_TMV

T-GGTAAAAAATAAAAATCATATTATCATTTTTGATATTATTAGGGTTTTTATTTATTTTTCTTTTTGGTA
AGCATCATGTTATTTTTGCTTCTGAACAAGACGAAGATATGGAAAAACAATAACTTCAATTTTAAATAA
AAAAAATCAAACAAATGAAATCGAA-ATAAATGCGAACAGATGTTAAAAAACATGCAAGAAATTAAGAT
AAATTGAAAAATATGGCAACAACCTCATCAAAAAGCAATATTAAAAAATTTAAATGAAGAAGATCAAAAAA
T-GTAAACGGGCGACAAAGAGGCCAAATTATCGAGTA-CTCGAGGGGT-GTCAAGA-GCATAA

ATL52_2520_C_Pf_TMV

ATGGTAAAAAATAAAAAATCATATTATCATTTTTGATATTATTAGGGTTTTTATTTATTTTT CTTTTTGGT
AAGCATCATGTTATTTTTGCTTCTGAACAAGACGAAGATATGGAAAAACA ATAACCTCAATTTTAAAT
AAAAAAATCAAACAAATGAAATCGAATATAAATGCGAACAG ATGTTAAAAAACATGCAAGAAATAAA
GATAAATTGAAAAATATGGCAACAACATCAA AAAGCAATATTAATAAATTTAAATGAAGAAGATCAA
AAAATTGTAAACGGGCGACAAAGA GGCCAAATTATCGAGTAACTCGAGGGGTAGTCAAGATGCATAA

ATL52_2520_C_Pr_TMV

T-GGTAAAAAATAAAAAATCATATTATCATTTTTGATATTATTAGGGTTTTTATTTATTTTTCTTTTTGGTA
AGCATCATGTTATTTTTGCTTCTGAACAAGACGAAGATATGGAAAAACAATAACTTCAATTTTAAATAA
AAAAAATCAAACAAATGAAATCGAATATAAATGCGAACAGATGTTAAAAAACATGCAAGAAATTAAGAT
AAATTGAAAAATATGGCAACAACATCAAAAAGCAATATTAATAAATTTAAATGAAGAAGATCAAAAAA
TTGTAAACGGGCGACAAAGAGGCCAAATTATCGAGTA-CTCGAGGGGTAGTCAAGATGCATAA

A.3 pBSG1057-*tengu C*

tengu_C

-----ACTCTTAATTAATGTCTGAACAAGACGAAGATAT
GGAAAAACAATAACTTCAATTTTAAATAAAAAAATCAAACAAATGAAATCGAATATAAATGCGAACAG
ATGTTAAAAAACATGCAAGAAATTAAGATAAATTGAAAAATATGGCAACAACATCAA AAAAGCAATAT
TAAAAAATTTAAATGAAGAAGATCAAAAAATTGTAAACGGGCGACAAAGAGGCCAAATTATCGAGTAA--

C1T2_1050_D_A

-GTAACCTACTAC-TCATC-TCAGTTCGTGTTCTTGTCATTAATTAATGTCTGAACAAGACGAAGATAT
GGAAAAACAATAACTTCAATTTTAAATAAAAAAATCAAACAAATGAAATCGAATATAAATGCGAACAG
ATGTTAAAAAACATGCAAGAAATTAAGATAAATTGAAAAATATGGCAACAACATCAA AAAAGCAATAT
TAAAAAATTTAAATGAAGAAGATCAAAAAATTGTAAACGGGCGACAAAGAGGCCAAATTATCGAGTAACT
CGAGGGGTAGTCAAGATGC

C1_T2_4550_B_A

-GAGATACTCTACCTCATCCTTCGTTTCGTGTTCTTGTTCATTAATTAATGTCTGAACAAGACGAAGATAT
GGAAAAACAATAACTTCAATTTTAAATAAAAAAATCAAACAAATGAAATCGAATATAAATGCGAACAG
ATGTTAAAAACATGCAAGAAATTAAGATAAATTGAAAAATATGGCAACAACTCATCAAAAAGCAATAT
TAAAAATTTAAATGAAGAAGATCAAAAAATTGTAAACGGGCGACAAAGAGGCCAAATTATCGAGTAACT
CGAGGGGTAGTCAAGATGC

C1T2_1050_C_A

-TTGGAATCAAA--TCATTTTCAGTTTCGTTGTTTTGTTCATTAATTAATGTCTGAACAAGACGAAGATAT
GGAAAAACAATAACTTCAATTTTAAATAAAAAAATCAAACAAATGAAATCGAATATAAATGCGAACAG
ATGTTAAAAACATGCAAGAAATTAAGATAAAT----AACT----CGAGGGGTAGTCAAGATGCA----
TAATAAAT---AACGGATTGTGTCGGTAAACGTGGTGCCTACGATAAATATGTCAAAATATCAAGCGACC
CTGGGGG-CTAGAGATGT

C1T2_4550_E_A

TCGAACATCGTAC-TCATC-TCAGTTCGTGTTCTTGTTCATTAATTAATGTCTGAACAAGACGAAGATAT
GGAAAAACAATAACTTCAATTTTAAATAAAAAAATCAAACAAATGAAATCGAATATAAATGCGAACAG
ATGTTAAAAACATGCAAGAAATTAAGATAAAT----AACT----CGAGGGGTAGTCAAGATGCA----
TAATAAAT---AACGGATTGTGTCGGTAAATC-----ACACGTGGTGCCTACGATAACGCATAGTGTTTTT
CCCTCAATAATCAAGATGC

A.4 pBSG1057-*tengu F*

tengu_F

-----ACTCTTAATTAATGTCTGAACAAGACGAAGA
TATGGAAAAACAATAACTTCAATTTTAAATAAAAAAATCAAACAAATGAAATCGAATATAAATGCGAA
CAGATGTTAAAAACATGCAAGAAATTAAGATAAATAACTCGAG-----

F1T6_1050_C_A

----TTGGAATCAAA--TCATTTTCAGTTTCGTTGTTTTGTTCATTAATTAATGTCTGAACAAGACGAAGA
TATGGAAAAACAATAACTTCAATTTTAAATAAAAAAATCAAACAAATGAAATCGAATATAAATGCGAA
CAGATGTTAAAAACATGCAAGAAATTAAGATAAATAACTCGAGGGGTAGTCA

F1T4_4550_F_A

-----AAGCATCCTAC-TCATC-TCCGTTTCGTGTTCTTGTCAATTAATAATGTCTGAACAAGACGAAGA
TATGGAAAAACAATAACTTCAATTTTAAATAAAAAAATCAAACAAATGAAATCGAATATAAATGCGAA
CAGATGTTAAAAACATGCAAGAAATTAAGATAAATTGA--AAAATATGGCAA

F1T4_4050_B_A

----GAGATACTCTACCTCATCCTTCGTTTCGTGTTCTTGTCAATTAATAATGTCTGAACAAGACGAAGA
TATGGAAAAACAATAACTTCAATTTTAAATAAAAAAATCAAACAAATGAAATCGAATATAAATGCGAA
CAGATGTTAAAAACATGCAAGAAATTAAGATAAATTGA--AAAATATGGCAA

F1T6_1050_E_A

ACCCCAAACATCCTAC-TCATC-TCAGTTTCGTGTTCTTGTCAATTAATAATGTCTGAACAAGACGAAGA
TATGGAAAAACAATAACTTCAATTTTAAATAAAAAAATCAAACAAATGAAATCGAATATAAATGCGAA
CAGATGTTAAAAACATGCAAGAAATTAAGATAAATTGA--AAAATATGGCAA

A.5 pBSG1057-*tengu G*

tengu_G

-----ATGGTAAAAAATAAAAAATCATATTATCATTGATATTATTAGGGTTTTTATTT
ATTTTTCTTTTTGGTAAGCATCATGTTATTTTTGCTTCTGAACAAGACGAAGATATGGAAAAACAATAA
CTTCAATTTTAAATAAAAAAATCAAACAAATGAAATCGAATATAAATGCGAACAGATGTTAAAAACAT
GCAAGAAATTAAGATAAAT-----

GTL5_4550_H_Pf_TMV

----CATTTAATTTAAATGGTAAAAAATAAAAAATCATATTATCATTGATATTATTAGGGTTTTTATTT
ATTTTTCTTTTTGGTAAGCATCATGTTATTTTTGCTTCTGAACAAGACGAAGATATGGAAAAACAATAA
CTTCAATTTTAAATAAAAAAATCAAACAAATGAAATCGAATATAAATGCGAACAGATGTTAAAAACAT
GCAAGAAATTAAGATAAATAACTCGAGGGTAGTCAAGATGCATA

GTL5_4550_G_Pf_TMV

-----C--TTAATT-AAATGGTAAAAAATAAAATTCATATTATCATTTTGATATTATCGAGGTTTTTATT
TATTTCTCTTTTTGGTAAGCATCATGTTATTTTTGCTTCTGAACAAGACGAAGATATGGAAAAACAATA
ACTTCAATTCTAAATAAAAAAAATCAAACAAATGAAATCGAATATAAATGCGAACAGATGTTAAAAACA
TGCAAGAAATTAAGATAAATAACTCGAGGGGTAGTCAAGATGCATA

GTL5_1050_F_Pf_TMV

CCTACTCGAGGTGGATAGGGATCGTTTGC GCGCTTTT-CGCTGTCCGTGTTCTATCAGTTCGTCTTTTT
GTATCCTGGGGCTTAGTGTTCGTCTATACAGGCGAAGAAATTCGGAGGATATCGTAGTCGCGCGTGGTC
GTCCTGAGCTCCCGATCGTGATTGGAGTTGGAGA--AGCGGACATCACAACCCCTCCGTCGCTCCGAGA
AGGTTCTCTCGACATCTATCGGCAGCGT--TCGCTGTCGGAC