



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

**“PROSPECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE FITOPLASMAS EN
FRUTALES DE CAROZO EN CHILE”**

Tesis para optar al Grado de Magíster en Ciencias Agropecuarias, Mención Sanidad Vegetal

CLAUDIA ANDREA REBOLLEDO VIDAL

**Director de Tesis
Dr. Nicola Fiore**

**Prof. Colaborador
Dr. Alan Zamorano Carrasco**

**Profesores consejeros
ERWIN ABALLAY ESPINOZA
JOSÉ LUIS HENRIQUEZ**

SANTIAGO-CHILE

2016

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE POSTGRADO

**“PROSPECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE FITOPLASMAS EN
FRUTALES DE CAROZO EN CHILE”**

Tesis presentada como parte de los requisitos para optar al Grado de Magíster en Ciencias Agropecuarias, Mención Sanidad Vegetal.

CLAUDIA ANDREA REBOLLEDO VIDAL

Calificaciones

DIRECTOR DE TESIS
Nicola Fiore
Ingeniero Agrónomo, PhD.

APROBADO

PROFESORES CONSEJEROS

Erwin Aballay Espinoza
Ingeniero Agrónomo, MS, PhD.

APROBADO

José Luíz Henríquez
Ingeniero Agrónomo, MS, PhD.

APROBADO

Santiago, Chile

2016

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Nicola Fiore, por permitirme desarrollar este hermoso trabajo, por su paciencia, motivación y calidad humana.

Al Dr. Alan Zamorano, por estar siempre dispuesto a responder mis dudas, por su simpatía y calidez.

A Nicolás Quiroga, por su simpatía, apoyo y tesón infinitos.

A la Señora Ana María, a Rosany Facundo, a Giovi Julca, a Claudia Abarca, Paloma Méndez, a la Gaby y a Lucía, por hacer del Laboratorio de Fitovirología un lugar especial y cálido.

A la Universidad de Chile y su Facultad de Ciencias Agronómicas, por permitir que se desarrolle ciencia para nuestra agricultura.

Al Servicio Agrícola y Ganadero, en especial a Claudio Moore Tello por generar los nexos y creer en mí.

A Pedro Gómez Rojas, por apoyarme en éste proyecto.

A Juan Carlos Dintrans, por motivarme siempre.

Tesis financiada con fondos del Proyecto FONDECYT 2014 N° 1140883

DEDICATORIA

A Dios y su naturaleza maravillosa.

A mis padres, Margarita y Luis.

A mis hermanos, Carmen, Luis y Felipe.

A mis sobrinos, Valentina y Cristóbal.

A mi compañero de vida, Mario.

A los campesinos y agricultores de éste país.

“La agricultura es la profesión propia del sabio, la más adecuada al sencillo y la ocupación más digna para todo hombre libre”.

Marco Tulio Cicerón (106-43 a.C.)

ÍNDICE

Capítulo I: Fitoplasmas en Frutales de Carozo.....	8
Antecedentes Generales.....	8
Enfermedades que afectan a los frutales de carozo	8
Fitoplasmas como agentes de enfermedades	9
Características generales de los fitoplasmas.....	9
Clasificación de los fitoplasmas	10
Diseminación y transmisión de fitoplasmas	10
Detección y control.....	11
Enfermedades causadas por fitoplasmas	12
Bibliografía.....	14
Capítulo II: Prospección y Caracterización Molecular de Fitoplasmas en Frutales de Carozo En Chile	20
Resumen	20
Abstract.....	21
Introducción.....	22
Hipótesis	23
Objetivo general	23
Objetivos específicos	23
Material y Métodos.....	24
Lugar de estudio	24
Material vegetal	24
Extracción de material vegetal	25
Análisis de PCR anidada	25
Gen <i>tuf</i>	25
Gen <i>16S rRNA</i>	26
Extracción de DNA	26
Electroforesis	26
Clonamiento y secuenciación.....	27

Análisis bioinformático	27
Resultados	28
Muestras colectadas	28
Sintomatología y resultados PCR anidada	28
Discusión.....	37
Conclusiones	39
Literatura citada.....	40

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Superficie de frutales de carozo por región	24
Cuadro 2. Partidores para la detección del gen <i>tuf</i>	25
Cuadro 3. Partidores universales para la detección de gen <i>16S rRNA</i>	26
Cuadro 4. Número de muestras obtenidas por Región y especie	28
Cuadro 5. Muestras positivas al gen <i>tuf</i> según el protocolo de Makarova y <i>col.</i> (2012).....	30
Cuadro 6. Muestras positivas al gen <i>16S rRNA</i>	31
Cuadro 7. Porcentajes de identidad nucleotídica del gen <i>tuf</i> entre el aislado chileno 10319 correspondiente a durazno y las referencias disponibles en GenBank.....	30
Cuadro 8. Porcentajes de identidad nucleotídica del gen <i>16S rRNA</i> entre el aislado de la muestra 10319 correspondiente a durazno y las referencias disponibles en GenBank	31
Cuadro 9. Porcentajes de identidad nucleotídica del gen <i>tuf</i> entre el aislado de la muestra 10355 correspondiente a cerezo y las referencias disponibles en GenBank	31
Cuadro 10. Porcentajes de identidad nucleotídica del gen <i>16S rRNA</i> entre el aislado de la muestra 10355 correspondiente a cerezo y las referencias disponibles en GenBank	31
Cuadro 11. . Porcentaje de identidad nucleotídica de secuencias entre los aislados (gen <i>16S rRNA</i>) y los registrados en GenBank	33

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Árboles de cerezo donde se observa a la izquierda planta infectada por fitoplasmas con ramas muertas y decaimiento general.....	28
Figura 2. Necrosis de floema en planta de cerezo infectada por fitoplasmas	29
Figura 3. Epinastía adaxial en hojas en planta de cerezo con presencia de fitoplasmas.....	29
Figura 4. Plantas de duraznero positivas a fitoplasmas con decaimiento generalizado.....	29
Figura 5. Árbol filogenético obtenido para las secuencias nucleotídica del gen <i>tuf</i> de muestras 10319 y muestra 10355. El aislado de referencia del fitoplasma 16SrIII-J (Hor72) es el único disponible en QBank	33
Figura 6. Árbol filogenético obtenido para las secuencias nucleotídica del gen <i>16S rRNA</i> de las muestras 10355 y 10319 desde	33
Figura 7. Análisis virtual en gel de poliacrilamida al 6%, que muestra algunos los perfiles de RFLP digeridos con la enzima <i>MseI</i> de los productos secuenciados en nested-PCR del gen <i>tuf</i> de aislados de duraznero (10319) y cerezo (10355). Secuencias de fitoplasma utilizadas como referencias (Cuadro 11): GVX (16SrIII-A), PB1 (16SrIII-C), SP1 (16SrIII-E), MW1 (16SrIII-F) y PoiBI (16SrIII-H) Hort72 (16SrIII-J) en comparación con los aislados 10319 y 10355; M: marcador molecular	35
Figura 8. Análisis virtual en gel poliacrilamida al 6% el cual muestra los perfiles de RFLP de los productos secuenciados en nested-PCR del gen <i>16S rRNA</i> de aislados de duraznero y cerezo digeridos con la enzima <i>HhaI</i> . Secuencias de fitoplasmas utilizadas como referencia en cuadro 11. M: Marcador molecular.	36
Figura 9. Análisis virtual en gel de poliacrilamida al 6%, el cual muestra los perfiles de RFLP de los productos secuenciados en nested-PCR del gen <i>16S rRNA</i> de aislados de duraznero y cerezo, digeridos con la enzima <i>BstUI</i> . Secuencias de fitoplasmas utilizadas como referencia en cuadro 11. M: Marcador molecular. X: Indica aislados descartados al realizar la digestión	36
Figura 10. Análisis virtual en gel poliacrilamida al 6% el cual muestra algunos de los perfiles de RFLP digeridos con la enzima <i>BstUI</i> de los productos secuenciados en nested-PCR del gen <i>16S rRNA</i> de aislados de duraznero y cerezo. Secuencias de fitoplasmas utilizadas como referencia.....	37

CAPÍTULO I

FITOPLASMAS EN FRUTALES DE CAROZO

Antecedentes generales

Entre los frutales de carozo, las principales especies cultivadas son ciruelo (*Prunus domestica* L.), duraznero (*Prunus persica* L.), nectarino (*Prunus nucipersica* L.), almendro (*Prunus dulcis* L.) y cerezo (*Prunus avium* L.), siendo los frutos de éste último el más comercializado y con mejor retorno económico. La producción mundial de cerezas en la temporada 2014-2015, alcanzó 2,41 millones de toneladas, cifra que va en aumento, siendo el principal productor Turquía, con 20,7% de la producción mundial en la última temporada, por otro lado, los países que muestran un mayor incremento en su producción son China y Chile (ODEPA, 2015b).

En Chile los frutales de carozo, se distribuyen entre los 33° 30' (Coquimbo) y los 40° 30' (Araucanía) latitud Sur. La superficie plantada informada es de 63.064 hectáreas (CIREN, 2015), con una producción exportada total de 186.527 toneladas y aproximadamente 690 millones de dólares exportados, constituyendo uno de los principales ejes económicos de la fruticultura (ODEPA, 2015a).

Sin embargo, a pesar del alto nivel de productividad existente, el manejo fitosanitario es un problema constante para alcanzar mejores volúmenes y calidad de la fruta requeridos por el mercado, siendo afectados constantemente por plagas y enfermedades que encarecen los costos de producción.

Enfermedades que afectan a los frutales de carozo

Los frutales de carozo son afectados por diversas plagas y enfermedades, siendo estas últimas las más complicadas de controlar debido principalmente a que existen escasas alternativas eficientes o, en algunos casos, simplemente no existen formas de control. Dentro de los fitopatógenos que afectan a estos frutales existen bacterias, hongos, virus, viroides y fitoplasmas.

Entre los problemas fitosanitarios de mayor impacto económico en Chile y a nivel mundial se encuentran enfermedades causadas por hongos como el plateado causado *Chondrostereum purpureum* Pouzar, la pudrición parda de los carozos causada por *Monilinia fructicola* Winter, la cloca causada por *Taphrina deformans* Berk., el corineo o tiro de munición, causado por *Wilsonomyces carpophilus* (Lév.), oídio causado por *Uncinula necator* (Schwein.) Burril; algunas enfermedades causadas por virus como *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV), *Tomato ringspot virus* (ToRSV) *Prune dwarf virus* (PDV), *Plum pox virus* (PPV) *Cherry green ring mottle virus* (CGRMV) y *Cherry necrotic rusty mottle virus*

(CNRMV) (Herrera y Madariaga, 2002; Fiore *et al.*, 2010; Fiore y Zamorano 2013). Entre las bacterias se encuentra *Rhizobium radiobacter* (Beijerinck and van Delden) (cepa fitopatógena: *Agrobacterium tumefaciens*) (Young *et al.*, 2001), causando la agalla del cuello y *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* van Hall (Latorre *et al.*, 2002a, b) agente causal del Tizón bacteriano. Con respecto a las fitoplasmosis de mayor importancia en el mundo en frutales de carozo se encuentran “European stone fruit yellows” (ESFY, '*Candidatus* Phytoplasma prunorum', '*Ca. P. prunorum*') en Europa (Cieślińska, 2011) y “Peach X-disease” ('*Ca. P. pruni*') en Estados Unidos (Davis *et al.*, 2013).

Fitoplasmas como agentes de enfermedades

La "amarillez del aster", fue reportada por primera vez en 1902 (Kunkel, 1926), la cual se creía que era causada por un agente viral, debido a que fue imposible obtener cultivos purificados del agente etiológico. Sin embargo, en 1967 se descubrió que las partículas observadas a través de microscopía electrónica en cortes ultrafinos del floema de las plantas afectadas por amarilleces, incluyendo la "amarillez del aster", eran similares a los micoplasmas que afectan a animales y humanos (Doi *et al.*, 1967). El descubrimiento en plantas, de bacterias que carecen de pared celular, provocó un cambio radical que permitió avanzar enormemente en el estudio de muchas enfermedades que se caracterizan por la presencia del síntoma denominado amarillez. Se utilizó el término "organismos parecidos a los micoplasmas" o “mycoplasma-like organisms” (MLOs), para referirse a los presuntos agentes causales de muchas de estas enfermedades (Lee y Davis, 1992). Posteriormente, en el 10° Congreso de la Organización Internacional de Micoplasmología en el año 1994, fue adoptado el nombre de "Phytoplasma"(Cousin, 1995).

Características generales de los fitoplasmas

Los fitoplasmas son procariontes pertenecientes a la clase de los Mollicutes, carentes de pared celular, característica que les confiere plasticidad, pleomorfismo y resistencia a compuestos antibacterianos que actúan inhibiendo la síntesis de la pared celular (Yu *et al.*, 1998). Son taxonómicamente cercanos a las bacterias Gram positivas, las cuales contienen un bajo porcentaje de guanina-citosina. Las bacterias Gram positivas y los fitoplasmas proceden de un ancestro común, pero a lo largo de su desarrollo los fitoplasmas redujeron su genoma perdiendo la pared celular (Reveles *et al.*, 2014).

La célula del fitoplasma está rodeada por una membrana plasmática trilaminar, de unos 10 nm de grosor, compuesta, al igual que en el resto de procariontes, de dos tercios de proteínas y un tercio de lípidos (Camarena y De la Torre, 2008). Su citoplasma contiene ribosomas para la síntesis proteica, y una molécula de ADN doble cadena circular, habiéndose detectado también la presencia de ADN extra-cromosómico (Nakashima y Hayashi, 1995; Davis *et al.*, 1998; Nishigawa *et al.*, 2001). Estos microorganismos son sensibles a la tetraciclina.

Los fitoplasmas poseen un tamaño celular que varía de 200 - 800 nm (Bertaccini, 2007). La plasticidad es una condición que los favorece para pasar de un tubo criboso a otro junto con la savia (Lee *et al.*, 2000; Christens *et al.*, 2005; Hogenhout *et al.*, 2008) prescindiendo de la

presencia de flagelos. Son parásitos estrictos del medio intracelular de plantas e insectos vectores. Su tamaño y crecimiento dependen del grado de desarrollo de los tubos cribosos donde se localizan (Camarena y De la Torre, 2008), desarrollan su ciclo de vida intracelularmente en los tubos cribosos y en los tejidos de insectos vectores. Debido a que los fitoplasmas no tienen la capacidad genética de sintetizar todos los nutrientes necesarios para su metabolismo, utilizan aquellos producidos por las células floemáticas, las que se debilitan y obstruyen provocando diversos desórdenes en la planta infectada.

Los fitoplasmas poseen un genoma que va desde los 530 hasta los 1350 kpb y es rico en adenina y timina (Razin, 1985; Neimark y Kirkpatrick, 1993), y su replicación es autónoma. Según Bertaccini *et al.* (2014) éstos se propagan por fisión binaria, gemación o fragmentación. Por otro lado, a través de estudios serológicos y moleculares se ha observado que los fitoplasmas poseen un gen que codifica una proteína de membrana única para cada especie.

Clasificación de los Fitoplasmas

Los fitoplasmas se clasifican e identifican según grupos y subgrupos ribosomales, los cuales se basan principalmente en el análisis de la secuencia 16S rDNA que corresponde al gen que codifica para el RNA ribosomal, subunidad 16S (Lee *et al.*, 1998). Además, se han estudiado otros genes idóneos para la detección e identificación de fitoplasmas, como el gen *tuf* que codifica para el factor de elongación Tu, la región intergénica 16S-23S rRNA; el gen *secY* que codifica para la subunidad SecY del complejo translocasa Sec y el gen que codifica para la proteína ribosomal (*rp*) (Bertaccini, 2007; Lee *et al.*, 2009).

Inicialmente, la forma de diferenciar a los fitoplasmas se basaba en las características biológicas tales como la sintomatología, tipo de hospederos y especificidad de transmisión por insectos vectores. A medida que la biología molecular se ha ido desarrollando, el ARN ribosomal ha alcanzado una mayor importancia en la investigación de la evolución bacteriana. Los genes ribosomales 16S y 23S poseen regiones altamente conservadas, sirviendo como marcadores moleculares en los estudios de filogenia. Lo anterior, ha servido para que las técnicas de diagnóstico y clasificación de los fitoplasmas se basen en patrones de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) del fragmento de 1,2 kpb del gen *16S rRNA* (Lee *et al.*, 1998). Por otro lado, con la disponibilidad de nuevas tecnologías como por ejemplo el “deep sequencing”, ha sido posible aumentar el número de secuencias completas o casi completas del genoma de diferentes especies de fitoplasmas. Esto permitió complementar eficazmente el análisis de la secuencia del 16S rDNA con el uso de otras regiones genómicas, logrando una diferenciación taxonómica a nivel intraespecífico. Ahora es posible incorporar en la caracterización molecular las secuencias del gen *tuf*, de la región intergénica 16S-23S rRNA, del gen *secY* y del gen *rp*, entre otros (Bertaccini, 2007; Lee *et al.*, 2009).

Las secuencias existentes en el NCBI (National Center for Biotechnology Information's) y a través de análisis de RFLPs *in silico*, se ha logrado clasificar o identificar 37 especies como '*Candidatus Phytoplasma*' ('*Ca. P.*'), 33 grupos y 118 subgrupos ribosomales (Lee *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2000; Arocha *et al.*, 2005). Actualmente, la identificación se realiza considerando la secuencia del gen *16S rRNA*, otros marcadores moleculares exclusivos de cada '*Ca. P.*' y, en caso de necesidad, las características biológicas.

Diseminación y transmisión de fitoplasmas

La diseminación de fitoplasmas ocurre principalmente a través de la propagación de material vegetal infectado y por medio de insectos vectores, nunca por transmisión mecánica. En el primer caso la transmisión se realiza a través de yemas, estacas, sarmientos, bulbos, tubérculos y rizomas. Un ejemplo de ello es lo que sucede con los tubérculos de papa, los cuales al ser cosechados no presentan síntomas, sin embargo, al brotar, el patógeno se multiplica debido a la generación y translocación de nutrientes al momento de la formación de brotes en el tubérculo (Leyva *et al.*, 2002). En general, el éxito de la transmisión es mermado por la distribución irregular de los fitoplasmas en las plantas madres. Por otro lado, Sugio *et al.* (2011), señalan que la facultad de cualquier planta para hospedar uno o más tipos de fitoplasmas, depende de la susceptibilidad a la infección e incluso del resultado de la interacción fitoplasma-planta–vector.

Los insectos vectores poseen un aparato bucal chupador-picador, se alimentan en el floema y transmiten los fitoplasmas según la modalidad persistente propagativa. Pertenecen al Orden Hemíptera y específicamente a las familias Cicadellidae, Cixiidae, Delphacidae, Derbidae, Flatidae y Psyllidae. La interacción insectos-fitoplasmas es compleja y presenta un cierto grado de variabilidad. Si consideramos que, para el éxito de la transmisión, estos microorganismos deben atravesar varias barreras al interior del insecto en su movimiento desde el intestino a las glándulas salivales y finalmente ser expulsados con la saliva, es esperable un elevado grado de especificidad vector-fitoplasmas. Sin dudas así es, porque la interacción se establece en base al tipo de proteína de la membrana fitoplasmática (IDP) y de los receptores específicos del vector que se localizan en las células del tracto intestinal y otros órganos. Sin embargo, Kakizawa *et al.* (2006), aun indicando que estas proteínas están estrictamente relacionadas con uno o más fitoplasmas, sugiriendo un alto grado de especificidad, también demuestran que pueden ser reconocidas por diferentes fitoplasmas pertenecientes a un mismo grupo ribosomal. Por otro lado, y a modo de ejemplo, según Christens *et al.* (2005), los fitoplasmas causantes de la amarillez del aster (“aster yellows”) pertenecientes al grupo ribosomal 16SrI, son transmitidos por lo menos a través de 24 especies de cicadélidos.

Los fitoplasmas pueden ser transmitidos también por semillas en algunas especies vegetales y por medio de plantas parásitas, como *Cuscuta* sp. (Avinent y Llácer, 1996; Laviña y Batlle, 1997). Ésta última también es utilizada para la investigación, ya que permite la transmisión de fitoplasmas de una planta infectada a una sana como la vinca (*Catharanthus roseus* L.), la cual es utilizada como planta indicadora y para el mantenimiento de la mayoría de los aislados de referencia de fitoplasmas (Lee *et al.*, 2000; Bertaccini, 2007; Bertaccini y Duduk, 2009).

Detección y control

El control de enfermedades causadas por fitoplasmas se basa en la prevención a través del uso de plantas sanas, control de insectos vectores y control de plantas hospederas secundarias. Sin embargo, el proceso de detección de fitoplasmas es complejo debido

básicamente a dos razones: la baja concentración de éstos en los tejidos vegetales infectados y la distribución errática en la planta (Gundersen y Lee, 1996; Green *et al.*, 1999). Existen diversas formas de detección, tales como la microscopía óptica (tinción DAPI) o electrónica, serología (dot blot, ELISA), hibridación molecular y técnicas híbridas, como ISEM (serología asociada a microscopía electrónica) (Lorenz *et al.*, 1995; Gundersen y Lee, 1996; Green *et al.*, 1999; Waterwork y Mock, 1999). A pesar de la diversidad de técnicas, estos métodos poseen una sensibilidad limitada, son poco prácticos al analizar un gran número de muestras y algunos no permiten realizar la identificación del fitoplasma encontrado. Actualmente, el método más utilizado para detectar e identificar fitoplasmas en vegetales es la Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR (Polymerase Chain Reaction), asociada al análisis del Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción o RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) (Gundersen y Lee, 1996; Green *et al.*, 1999; Waterwork y Mock, 1999). La PCR permite amplificar zonas del gen *16S rRNA* utilizando parejas de partidores específicos, aplicados en PCR anidada, para aumentar la sensibilidad de la detección de fitoplasmas (Ahrens y Seemüller, 1992; Gundersen y Lee, 1996; Laviña y Batlle, 1997).

Enfermedades causadas por fitoplasmas

Las enfermedades asociadas a la presencia de fitoplasmas, se reconocen por un conjunto de síntomas, que sugieren profundas alteraciones en el equilibrio hormonal de la planta y la fotosíntesis. Alteran el contenido del floema, los compuestos de reserva, entre otros. Además, la manifestación de síntomas depende de la condición ambiental, genotipo y estado de desarrollo de la planta, y del tipo de fitoplasma. Los más frecuentes son; amarilleces, esterilidad de las flores, virescencia, filodia, proliferación de yemas adventicias, enanismo generalizado, enrollamiento de las hojas y decaimiento general de la planta (Lee *et al.*, 2000; Musetti *et al.*, 2000). Los síntomas de la “amarillez europea de los frutales de carozo” o ESFY (European stone fruit yellows), '*Candidatus* Phytoplasma prunorum', son enrollamiento de hojas, clorosis, deformación de hojas, disminución del crecimiento, necrosis en floema y muerte de ramas y troncos, decaimiento. En especies más susceptibles, tales como damasco y ciruelo japonés, puede causar la muerte de la planta (Morvan 1977; Giunchedi *et al.*, 1982; Lederer y Seemüller 1992; Marcone *et al.*, 1996; Kison y Seemüller 2001; Poggi Pollini *et al.*, 2001; Torres *et al.*, 2004).

Las enfermedades causadas por este tipo de patógenos muestran, en los últimos años, un aumento en la incidencia y una amenaza en el futuro, siendo incluso factores limitantes para la producción en numerosos cultivos (McCoy *et al.*, 1989). Actualmente se han reportado varias enfermedades en diferentes especies de plantas pertenecientes a 98 familias botánicas, en 85 países (Costanzo, 2012), cuyo origen era desconocido, las cuales son causadas por fitoplasmas. Por otro lado, la distribución de los fitoplasmas aparentemente se relaciona con la existencia de plantas hospederas y de insectos vectores, éstos últimos cumplen un rol importante en la diseminación de las enfermedades. Así es como, el grupo ribosomal 16SrVII que causa la amarillez del fresno, el grupo 16SrVI, la proliferación del trébol, y la mayor parte del grupo 16SrIII causante de la enfermedad “X” (X-disease) del Oeste parecen estar distribuidos en la parte occidental del continente Americano. Por otro lado, los fitoplasmas del grupo 16SrII, de la escoba de bruja de la nuez y el grupo del enanismo amarillo del arroz (16SrXI), se limitan a la región del Sudeste Asiático. El grupo 16SrX

causante de la proliferación del manzano y subgrupo stolbur (16SrXII-A), por su parte, se concentran en el continente Europeo (Bisognin *et al.*, 2008).

Los fitoplasmas relacionados con un hospedero vegetal pueden distribuirse otras zonas geográficas. Lo anterior señala que los fitoplasmas se han distribuido más allá de las regiones donde se originaron, especialmente si en los nuevos nichos ecológicos existen hospederos e insectos vectores similares. Algunos fitoplasmas, como el 16SrI-B, han llegado a dispersarse por todo el mundo, en cambio otros se han quedado aislados en nichos ecológicos evolucionando de manera independiente a partir de cepas parentales (Lee *et al.*, 2003).

En Chile, la primera observación de síntomas asociados a fitoplasmas ocurrió en el año 1945; en parcelas experimentales se informó la presencia de plantas de remolacha con “marchitez”. Solo en el 1997 se relacionó esta enfermedad con la presencia de fitoplasmas (Hepp y Sandoval, 1997). Estudios siguientes realizados en la vid, identificaron molecularmente el fitoplasma “aster yellows” (subgrupos 16SrI-B y 16SrI-C), “Stolbur” (subgrupo 16SrXII-A) y de los subgrupos ribosomales 16SrV-A, 16SrVII-A y 16SrIII-J (Fiore *et al.*, 2007; Gajardo *et al.*, 2009; González *et al.*, 2010). Además se han identificado infecciones causadas por fitoplasmas en plantas nativas y cultivos de importancia económica, como cerezo (*Prunus avium*), murtila (*Ugni molinae* Turcz.), chaura [*Gaultheria phillyreifolia* (Pers.) Sleumer], peonia (*Paeonia lactiflora* Pall), remolacha azucarera (*Beta vulgaris* L.) (Gajardo *et al.*, 2009; Arismendi *et al.*, 2010; González *et al.*, 2011; Fiore *et al.*, 2012; Fiore *et al.*, 2015).

Por otro lado, se ha determinado la presencia de fitoplasmas en distintas especies de malezas: *Convolvulus arvensis* L., de ciclo perenne, presentando fitoplasmas de los subgrupos 16SrI-B, 16SrVII-A y 16SrXII-A; mientras que a su vez *Polygonum aviculare* L., maleza de tipo anual, presenta fitoplasmas de los subgrupos 16SrI-B, 16SrVII-A. En *Galega officinalis* L., maleza de tipo perenne, se encontraron los fitoplasmas de los subgrupos 16SrVII-A y 16SrIII-J. Basándose en lo anterior, los autores concluyeron que dichas malezas actúan como reservorio natural de los fitoplasmas encontrados en ellas, pues comparten los mismos subgrupos de fitoplasmas con el cultivo de la vid (Fiore *et al.*, 2007; Longone *et al.*, 2011; Zamorano *et al.*, 2015). La presencia de estos patógenos en las plantas depende tanto de la propagación de plantas infectadas y la actividad trófica de insectos tales como *Paratanus exitiosus* (Beamer) y *Bergallia valdiviana* Berg 1881, que transmiten el fitoplasma 16SrIII-J (X-disease group) (Longone *et al.*, 2011; Quiroga *et al.*, 2015). Por último, la evidencia reportada a la fecha señala que los fitoplasmas pertenecientes a los subgrupos ribosomales 16SrIII-J y 16SrVII-A, son los más frecuentes en Chile, afectando vides, cerezo, murtila, chaura, peonías y varias especies de malezas (Gajardo *et al.*, 2009; Arismendi *et al.*, 2010; Arismendi *et al.*, 2011).

Finalmente, en relación a los frutales de carozo, los únicos estudios asociados a fitoplasmas que se han realizado en el país corresponden a dos identificaciones puntuales en durazno (fitoplasma 16SrXII-A) y cerezo (16SrIII-J) (Paltrinieri *et al.*, 2006; Gonzalez *et al.*, 2011), lo que hace esencial conocer la situación actual de estos patógenos en las principales zonas productivas de estos cultivos.

BIBLIOGRAFÍA

Ahrens, U., and Seemüller, E. 1992. Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology*. 82:828-832.

Arismendi, N., Andrade, N., Riegel, R., Carrillo, R. 2010. Presence of a phytoplasma associated to “witches’ broom” disease in *Ugni molinae* Turcz. and *Gaultheria phillyreifolia* (Pers.) Sleumer determined by DAPI, PCR and DNA sequencing. *Chilean Journal of Agricultural Research* 70: 26-33.

Arismendi, N., González, F., Zamorano, A., Andrade, A., Pino, A. M., and Fiore, N. 2011. Molecular identification of ‘*Candidatus* Phytoplasma fraxini’ in murtilla and peony in Chile. *Bulletin of Insectology*, 64: 95-96.

Arocha, Y., López, M., Piñol, B., Fernández, M., Picornell, S., Almeida, R., Palenzuela, I., Wilson M. R., and Jones, P. 2005. ‘*Candidatus* Phytoplasma graminis’ and ‘*Candidatus* Phytoplasma caricae’, two novel phytoplasmas associated with diseases of sugarcane, weeds and papaya in Cuba. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55: 2451-2462.

Avinent, L., y Llácer, G. 1996. Fitoplasmas y espiroplasmas fitopatógenos. Pp 443-483. En: G.Llácer, M. M. López, A. Trapero y A. Bello (Ed). *Patología Vegetal*. Soc. Española de fitopatología. España.

Bertaccini, A. 2007. Phytoplasmas: diversity, taxonomy and epidemiology. *Frontiers in Bioscience* 12: 673-689.

Bertaccini, A., and Duduk. B. 2009. Phytoplasma and phytoplasma diseases: a review of recent research. *Review Phytopathology Mediterranea* 48: 355-378.

Bertaccini, A., Duduk, B., Paltrinieri, S., Contaldo, N. 2014. Phytoplasmas and phytoplasma diseases: A severe threat to agriculture. *American Journal of Plant Sciences*. Vol.5 No 12(2014), 26 pp.

Bisognin, C., Schneider, B., Salm, H., Grando, M., Jarausch, W., Moll, E., Seemüller, E. 2008. Apple proliferation resistance in apomictic rootstocks and its relationship to phytoplasma concentration and simple sequence repeat genotypes. *Phytopathology*. Volume 98, Number 2: 153-158.

Camarena, G., y De la Torre, R. 2008. Fitoplasmas: Síntomas y Características Moleculares. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 14 (2): 81 – 87.

Christens, N. M., Axelsen, K. B., Nicolaisen, M., Schulz, A. 2005. Phytoplasmas and their interactions with hosts. *TRENDS in Plant Science* 10: 526-535.

Cieślińska, M. 2011. European stone fruit yellows disease and its causal agent 'Candidatus Phytoplasma prunorum. Journal of Plant Protection Research. Vol. 51: 441-447.

CIREN - ODEPA. 2015. Catastro Frutícola: Principales resultados, Julio 2015. Centro de Información de Recursos Naturales (CIREN) y Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA). 53 pp.

Costanzo, S., 2012. New pest response guidelines, in: Robert E. Davis (Ed.), Selected 'Candidatus Phytoplasma spp.' of Apple, Grape and Peach The U.S. Department of Agriculture, pp. 1-210.

Cousin, M.T. 1995. Phytoplasmes et phytoplasmoses. Agronomie 15: 245-264.

Davis, R., Jomantiene, R., Dally, I., y Wolf, T. 1998. Phytoplasmas associated with grapevine yellows in Virginia belong to group 16SrI, subgroup A (tomato big bud phytoplasma subgroup), and group 16SrII, new subgroup I. Vitis 37: 131-137.

Davis, R.E., Zhao, Y., Dally, E.L., Lee, I.M., Jomantiene, R. and Douglas, S.M. 2013. 'Candidatus Phytoplasma pruni', a novel taxon associated with X-disease of stone fruits, *Prunus* spp.: multilocus characterization based on *16S rRNA*, *secY*, and Ribosomal Protein genes. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 63: 766-776.

Doi, Y., Teranaka, M., Yora, K., Asuyama, H., 1967. Mycoplasma-or PLT group-like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches' broom, aster yellows, or paulownia witches' broom. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn 33: 259-266.

Fiore, N., González, X., Zamorano, A., Quiroga, N., Paillalef, R., Pino, A. M. 2015. Phytoplasmas associated with yellow wilt disease of sugar beet in Chile. Phytopathogenic Mollicutes 5 (1): S63-S64.

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

Fiore, N., Prodan, S., Paltrinieri, S., Gajardo, A., Botti, S., Pino, A. M., Montealegre, J., and Bertaccini, A. 2007. Molecular characterization of phytoplasmas in Chilean grapevine. Bulletin of Insectology 60: 331-332

Fiore, N, y Zamorano, A. 2013. First report of *Cherry green ring mottle virus* and *Cherry necrotic rusty mottle virus* in sweet cherry (*Prunus avium* L.) in Chile. Plant Disease 97 (8): 1122.

Fiore, N., Zamorano, A., González, F., Pallas, V., Sánchez – Navarro, J., Rosales I. M., Peña, E., Rivera, L., y Pino, A. M. 2010. Virus y viroides en frutales de carozo en Chile. Simiente 80 (3-4) 1-178; 2010.

- Gajardo, A., Fiore, N., Prodan, S., Paltrinieri, S., Botti, S., Pino, A. M., Zamorano, A., Montealegre, J., Bertaccini A. 2009. Phytoplasmas associated with grapevine yellows disease in Chile. *Plant Disease* 93: 789-796.
- Giunchedi L., Poggi Pollini C., Credi R. 1982. Susceptibility of stone fruit trees to the Japanese plum tree decline causal agent. *Acta Horticulturae* 130: 285–290.
- González, F., Zamorano, A., Pino, A. M., Fiore, N. 2010. Caracterización molecular de nuevos fitoplasmas en la vid en Chile. Resúmen XIX Congreso SOCHIFIT, Pucón, Chile, 9-12 noviembre 2010, p 103.
- González, F., Zamorano, A., Pino, A. M., Fiore, N. 2011. Identification of phytoplasma belonging to X-disease group in cherry in Chile. *Bulletin of Insectology* 64 (Supplement): S235-S236, 2011.
- Green, M. J., Thomsom D. A., and Mackenzi. D. J. 1999. Easy and efficient DNA extraction from woody plants for the detection of phytoplasmas by polymerase chain reaction. *Plant Disease*. 83(5): 482-485. Araucanía. p.44. In: Libro de Resúmenes 60° Congreso Agronómico de Chile, 27-30 Octubre de 2009. Talca, Chile.
- Gundersen, D. E., and Lee, Y. M. 1996. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primers pairs. *Phytopathol. Mediterr.* 35: 144-151.
- Hepp, R., y Sandoval, C. 1997. Estudios en marchitez amarilla de la remolacha (*Beta vulgaris* L. var. *saccharifera*). *AgroCiencia*, 13: 253-256.
- Herrera, M. G. y Madariaga, M. 2002. Incidencia de Prunus necrotic ringspot virus (PNRSV), Prune dwarf virus (PDV), Tomato ringspot virus (ToRSV) y Plum pox virus (PPV) en viveros de frutales de carozo de la zona central de Chile. *Agricultura Técnica* 62(1): 38-45.
- Hogenhout, S., Oshima, K., Ammar, E., Kakizawa, S., Kingdom, N., and Namba, S. 2008. Phytoplasmas: bacteria that manipulate plants and insects. *Molecular Plant Pathology*, 9(4): 403-423.
- Kakizawa, S., Oshimada, K., Jung, H., Suzuki, S., Nishigawa, H., Arashida, R., Miyata, S., Ugaki, M., Kishino, H., Namba, S. 2006. Positive selection acting on a surface Membrane Protein of the Plant-Pathogenic Phytoplasmas. *Journal Bacteriology*. Vol. 188 no. 9.(3424-3428).
- Kison and Seemuller. 2001. Differences in strain virulence of the European stone fruit yellows phytoplasma and susceptibility of stone fruit trees on various rootstocks to this pathogen. *Journal of Phytopathology* 149 (9): 533-541.
- Kunkel, L., 1926. Studies on aster yellows. *American Journal Botany* 23, 646–705.

Latorre, B., Rioja, M., and Lillo, C. 2002a. Effects of temperature on infection and a warning system for pear blossom blast caused by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Crop Protection* 21:33-39.

Latorre, B., Viertel, S., Rioja, M., y Lillo, C. 2002b. Susceptibilidad de la flor y efecto de la temperatura sobre el desarrollo del tizón bacteriano del peral. *Fitopatología*: 37:81.

Laviña, A., y Batlle, A. 1997. Identificación de fitoplasmas de la viña en diferentes áreas vinícolas de España. *Técnicas de Identificación. Viticultura Profesional* (52): 32-36.

Lederer, M., and Seemüller, E. 1992. Demonstration of mycoplasmas in *Prunus* species in Germany. *J. Phytopathol.* 134 (2): 89–96.

Lee, I.-M., Davis, R., 1992. Mycoplasmas which infect plants and insects. *American Society for Microbiology, Washington, DC (USA)*. 379-390.

Lee, I.; Gundersen-Rindal, D., y Bertaccini, A. 1998. Phytoplasma: Ecology and genomic diversity. *Phytopathology* 88: 1359-1366.

Lee, I., Davis, R., y Gundersen-Rindal, D. 2000. Phytoplasma: Phylogenic Mollicutes. *Annual Review of Microbiology* 54: 221-255.

Lee, M., Martini, M., Bottner, K., Dane, R., Black, M., and Troxclair N. 2003.. Ecological implications from a molecular analysis of phytoplasmas involved in an Aster Yellows epidemic in various crops in Texas. *Phytopathology*. Volume 93, Number 11: 1368-1377.

Lee, I. M., Zhao, Y., and Davis, R. E. 2009. Prospects of multiple gene-based systems for differentiation and classification of phytoplasmas. Chapter: 4 Pp 51. In: *Phytoplasmas: 58 Genomes, Plant Hosts and Vectors*. Edited by Weintraub, P. G., Gilat Research Center, Israel and Jones, P., Rothamsted Research, UK 336 p.

Leyva, N., Ochoa, J., Leal, D., Martínez, J. 2002. Multiple phytoplasmas associated with potato diseases in México. *Canadian Journal of Microbiology* 48: 1062-1068.

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

Lorenz, K. H., Schneider, B., Ahrens, U., and Seemüller E. 1995. Detection of the Apple proliferation and pear decline phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and nonribosomal DNA. *Phytopathology* 85 (7): 771-776.

Marcone C., Ragozzino A., Seemüller E. 1996. European stone fruit yellows phytoplasma as the cause of peach vein enlargement and other yellows and decline diseases of stone fruits in Southern Italy. *J. Phytopathol.* 144 (11–12): 559–564.

McCoy, R., Caudwell, A., Chang, C., Chen, T., Chykowski, L., Cousin, M., Dale, J., de Leeuw, J., Golino, D., Hackett, K., Kirkpatrick, B., Marwitz, R., Petzold, H., Sinha, R.,

Sugiura, M., Whitcomb, R., Yang, Y., Zhu, B., y Seemüller, E. 1989. Plant diseases associated with mycoplasma-like organisms. Pp 546-640. En: Whitcomb, R. y Tully, J. (eds.). *The Mycoplasmas Vol. V* Academic Press New York.

Morvan G. 1977. *Apricot chlorotic leaf roll*. EPPO Bull. 7: 37–55.

Musetti, R., Favali, M. A., Pressacco, L. 2000. Histopathology and polyphenol content in plants infected by phytoplasmas. *Cytobios* 102, 133-147.

Nakashima, K., y Hayashi, T. 1995. Multiplication and distribution of rice yellow dwarf phytoplasma in infected tissues of rice and green rice leaf hopper *Nephotettix cincticeps*. *Phytopathological Society of Japan* 61:451-455.

Neimark, H. C., and Kirkpatrick, B. C. 1993. Isolation and characterization of full length chromosomes from non-culturable plant pathogenic mycoplasma like organisms *Mol. Microbiol.* 7, 21-28. Nom.

Nishigawa, H., Miyata, S., Oshima, K., Sawayanagi, Komoto, A., Kuboyama, T. 2001. Plant expression of a protein encoded by the extrachromosomal DNA of a phytoplasma and related to geminivirus replication proteins. *Microbiology* 147: 507-513.

ODEPA. 2015a. Boletín Frutícola: avance enero de 2015. Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA). 21 pp.

ODEPA. 2015b. Boletín Frutícola. Cerezas: Frutas en expansión. Agosto 2015. Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA).

Paltrinieri, S., Botti, S., Dal Molin, F., Mori, N., Fiore, N., Bertaccini, A. 2006. Are phytoplasmas involved in a severe peach decline? *Acta Horticulturae* 713: 421-426.

Poggi, Pollini C., Bissani R., Ginchedi, L. 2001. Occurrence of European stone fruit phytoplasma (ESFYP) infection in peach orchards in Northern-Central Italy. *J. Phytopathol.* 149 (11–12): 725–730.

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

Razin, S. 1985. Molecular biology and genetics of mycoplasmas. *Review Microbiology* 49: 419 - 455.

Reveles, L., Velasquez, R., Muricio, J. 2014. Fitoplasmas: Otros agentes fitopatógenos. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. México. 49pp.

Sugio A., MacLean, A., Kingdom, H., Grieve, V., Manimekalai, R., Hogenhout, S. 2011. Diverse Targets of Phytoplasma Effectors: From Plant Development to Defense Against Insects. *Annual Review of Phytopathology*. Vol. 49: 175-195.

Torres E., Martin M.P., Paltrinieri S., Vila A., Masalles R., Bertaccini, A. 2004. Spreading of ESFY phytoplasmas in stone fruit in Catalonia (Spain). *J. Phytopathol.* 152 (7): 432–437.

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

Young, J.M., Kuykendall, L.D., Martínez-Romero, E., Kerr, A. and Sawada H. 2001. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie *et al.* 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51: 89–103.

Yu, Y. L., Yeh, K.W., Lin, C. P. 1998. An antigenic protein gene of a phytoplasma associated with sweet potato witches broom. *Microbiology* 144, 1257- 1262.

Zamorano, A., González, X., Pino, A. M., Quiroga, N., Fiore, N. 2015. Detection of 16SrIII-J phytoplasma in *Galega officinalis* L., a weed commonly associated to pome fruit orchards in Chile. *Phytopathogenic Mollicutes* 5(1-S): S115-S116.

CAPÍTULO II

PROSPECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE FITOPLASMAS EN FRUTALES DE CAROZO EN CHILE

RESUMEN

En lo que respecta a la producción y exportación de frutales, los carozos son los principales frutos exportados ya sea en volumen como desde el punto de vista económico. Chile posee más de 60 mil hectáreas de superficie de éste tipo de frutal, sin embargo, a pesar del alto nivel de producción, el manejo fitosanitario es un problema constante y limitante de los volúmenes cosechados. Es así como dentro de las enfermedades que afectan a los frutales de carozos a nivel mundial, los fitoplasmas han tomado relevancia, principalmente debido a la disminución, tanto de producción como de la calidad de los frutos sumado a la inexistencia de herramientas de control efectivas. En Chile, existe muy poca información relacionada con los fitoplasmas en carozos, por esta razón, es importante la realización de estudios de las enfermedades asociadas a éstos, y establecer así una base sólida para enfrentar la eventual presencia de estos patógenos y disminuir las pérdidas económicas. La presente investigación tuvo por objetivo detectar e identificar molecularmente fitoplasmas en viveros y huertos comerciales de frutales de carozos en Chile. Para detectar e identificar estos patógenos se colectaron muestras con síntomas asociados a presencia de fitoplasmas. La obtención de las muestras se realizó en las principales zonas productoras, y fueron analizadas utilizando la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa anidada (PCR-anidada). Posteriormente, se realizó un estudio filogenético utilizando herramientas bioinformáticas, para identificar y caracterizar molecularmente los fitoplasmas encontrados. Los resultados señalan la presencia del fitoplasma 16SrIII-J en huertos de frutales de carozo. Se informa la primera detección del fitoplasma 16SrIII-J en durazno al que se asocia decaimiento general de las plantas. Por otro lado, se confirma la presencia del 16SrIII-J en cerezo. Finalmente, no se detectó en Chile el “European stone fruit yellows” (ESFY, '*Candidatus P. prunorum*') ni el “peach X-disease” ('*Candidatus P. pruni*'), fitoplasmas responsables de graves enfermedades en frutales de carozo, en Europa y Estado Unidos, respectivamente.

Palabras claves: gen *tuf*, PCR-anidada, RFLP, secuenciación, gen *16S rRNA*.

ABSTRACT

With regard to the production and export of fruit, stone fruit are the main fruit exported either in volume and from the economic point of view. Chile has more than 60 miles hectares of this type of fruit, however, despite the high level of production, the plant management is an ongoing problem and limitation of harvested volumes. Among many biotic agents related with diseases affecting pits worldwide, phytoplasma have taken importance mainly due to the decrease in both production and the quality of the fruits, all of this added to the lack of effective field control tools. In Chile, there is little information regarding phytoplasma in stone fruits, therefore, is of high concern the development of studies of diseases associated with them, which give a solid foundation to face the possible presence of these pathogens and thus reduce economic losses. This research was aimed at molecularly detect and identify phytoplasmas in nurseries and commercial orchards of stone fruit in Chile. To detect and identify these pathogens samples were collected with symptoms associated with the presence of phytoplasma. Obtaining samples was performed in the main producing areas, and were analyzed using the technique of Chain Reaction nested polymerase (PCR - nested). Subsequently, a phylogenetic study using bioinformatics tools to identify and molecularly characterize the phytoplasma found was performed. The results indicate the presence of phytoplasma 16SrIII-J in stone fruit orchards. It reported the first detection of phytoplasma 16SrIII-J peach in which general decay of plants is associated. Furthermore the presence of cherry 16SrIII-J is confirmed. Finally, it was not detected in Chile the "European stone fruit yellows " (ESFY, '*Candidatus* P. prunorum') and the "peach X - disease" ('*Candidatus* P. pruni'), phytoplasma responsible for serious diseases in stone fruit in Europe and the United States respectively.

Palabras claves: *tuf* gene, nested-PCR, RFLP, sequencing, *16S rRNA* gene.

INTRODUCCIÓN

Los principales frutales de carozo cultivados en Chile son ciruelo, cerezo, duraznero, nectarino y almendro, los cuales se distribuyen entre los 33° 30' (Coquimbo) y los 40° 30' (Araucanía) latitud Sur. La superficie plantada informada es de 62.110 hectáreas, con una producción total de 24.959 toneladas (ODEPA, 2014), constituyendo uno de los principales ejes económicos de la fruticultura a través de las exportaciones. Sin embargo, a pesar del buen nivel de productividad existente, el manejo fitosanitario es un problema constante para alcanzar mejores volúmenes y calidad de la fruta.

Los frutales de carozo son afectados por diversas plagas y enfermedades, siendo estas últimas las más complicadas de controlar debido principalmente a que hay escasas opciones eficientes de control o, para algunas enfermedades, simplemente no existen terapias curativas. Dentro de los fitopatógenos que afectan a estos frutales existen bacterias, hongos, virus, viroides y fitoplasmas. Los fitoplasmas son procariotas pertenecientes a la clase de Mollicutes, carentes de pared celular, característica que les confiere plasticidad, pleomorfismo y resistencia a compuestos antibacterianos que actúan inhibiendo la síntesis de la pared celular (Yu *et al.*, 1998). La plasticidad es una condición que los favorece para pasar de un tubo criboso a otro junto con la savia (Lee *et al.*, 2000; Christens *et al.*, 2005; Hogenhout *et al.*, 2008) prescindiendo de la presencia de flagelos. Son parásitos estrictos del medio intracelular de plantas (solo floema) e insectos vectores. Su tamaño y crecimiento dependen del grado de desarrollo de los tubos cribosos donde se localizan (Camarena y De la Torre, 2008). Las enfermedades causadas por este tipo de patógenos muestran, en los últimos años, un aumento en la incidencia y una amenaza en el futuro, siendo incluso factores limitantes para la producción en numerosos cultivos (McCoy *et al.*, 1989).

En Chile, se han identificado infecciones causadas por fitoplasmas en plantas nativas y cultivos de importancia económica, como vid (*Vitis vinifera* L.), cerezo (*Prunus avium* L.), murtilla (*Ugni molinae* Turcz.), chaura [*Gaultheria phillyreifolia* (Pers.) Sleumer], peonía (*Paeonia lactiflora* Pall), remolacha azucarera (*Beta vulgaris* L.) (Gajardo *et al.*, 2009; Arismendi *et al.*, 2010; González *et al.*, 2011; Fiore *et al.*, 2012; Fiore *et al.*, 2015). En relación a los frutales de carozo, los únicos estudios asociados a fitoplasmas que se han realizado en el país corresponden a dos identificaciones puntuales en duraznero y cerezo (Paltrinieri *et al.*, 2006; Gonzalez *et al.*, 2011).

Por otro lado, con respecto a la identificación y clasificación, esta se basa según las secuencias existentes en el NCBI (National Center for Biotechnology Information's) complementando con análisis de RFLPs *in silico*, lo que permitió clasificar o identificar 37 especies como 'Candidatus Phytoplasma' ('Ca. P.')., 33 grupos y 118 subgrupos ribosomales (Lee *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2000; Arocha *et al.*, 2005). Actualmente, la identificación se realiza considerando la secuencia del gen *16S rRNA*, otros marcadores moleculares exclusivos de cada 'Ca. P.' y, en caso de necesidad, las características biológicas.

HIPOTESIS

Los fitoplasmas presentes en frutales de carozo en Chile son diferentes a los que afectan los mismos cultivos en el mundo.

OBJETIVO GENERAL

Detectar e identificar los fitoplasmas presentes en frutales de carozo en Chile.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Detectar la presencia de fitoplasmas en viveros y huertos comerciales de frutales de carozo.
2. Identificar molecularmente los fitoplasmas presentes en frutales de carozo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de estudio

El estudio se realizó en dos etapas: primero el trabajo de campo, el que corresponde a la obtención del material vegetal, en las siguientes regiones: Valparaíso, Metropolitana, Libertador Bernardo O'Higgins, Maule, Bío-Bío y La Araucanía; y segundo, el trabajo de detección y caracterización de fitoplasmas, el cual se desarrolló en el laboratorio de Fitovirología de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile.

Material vegetal

El material vegetal se obtuvo de plantas de viveros y huertos comerciales de frutales de carozo. El criterio de muestreo se basó en coleccionar ramillas con hojas, flores y/o frutos con sintomatología asociada a fitoplasmas, tales como amarilleces, virescencia, filodia, proliferación de yemas adventicias, enanismo generalizado, enrollamiento de las hojas, decaimiento general de la planta, deformación de hojas, necrosis en floema y muerte de ramas y troncos. El número de muestras obtenido fue proporcional a la superficie por especie existente en cada región de acuerdo al último catastro frutícola realizado para cada una (Cuadro 1).

Cuadro 1. Superficie de frutales de carozo por región (Fuente: CIREN-ODEPA, 2015)

Especie / Región	Valparaíso	Metropolitana	O'Higgins	Maule	Biobío	Araucanía	Total / especie
Almendro	1043.3	3412.1	2780.3	33	7.8	0	7276.5
Cerezo	242.7	1814.2	4967.5	8087.1	1309.7	382	16803.2
Ciruelo europeo	134.5	3119.8	7613.2	842.7	65.4	0	11775.6
Ciruelo japonés	112.8	1454	3246.8	797.9	0	0	5611.5
Damasco	295.4	269.7	176.2	0	0.5	0	741.8
Duraznero Fresco	304.1	712.8	1720.9	9.8	1.4	0	2749
Duraznero Conservero	3049.2	992.7	5674.9	364.2	0.6	0.3	10081.9
Nectarino	326.6	1315.8	3515.7	45.1	1.7	0	5204.9
Total/región	5508.6	13091.1	29695.5	10179.8	1387.1	382.3	60244.4

Las muestras se colectaron desde el mes de octubre de 2014 hasta el mes de mayo de 2015. A cada muestra se le asignó un código correlativo, cada planta fue georeferenciada, y además se realizó un registro fotográfico de su sintomatología. Posteriormente, el material se trasladó al Laboratorio de Fitovirología en neveras.

Extracción de material vegetal

Para cada muestra se extrajeron 3 gramos de nervaduras, los cuales se almacenaron a -80°C.

Extracción de DNA

A partir de un gramo de nervadura, se extrajeron los ácidos nucleicos totales, a través del método fenol-cloroformo, el cual utiliza tampón tris-EDTA pH 7,6, el que es mantenido a 4°C. De ésta extracción 20 ng/μl de ácido nucleico fueron usados para PCR (Prince *et al.*, 1993).

Análisis de PCR anidada

La técnica de PCR anidada o “nested” PCR, es utilizada para la detección de los fitoplasmas en plantas, ésta consiste en un primer PCR con partidores universales, cuyo producto de amplificación se somete a un segundo PCR con otra pareja de partidores universales, para aumentar la sensibilidad de la técnica (Gundersen y Lee, 1996).

Los partidores utilizados en este estudio amplifican regiones del genoma del fitoplasma correspondientes a dos genes:

Gen tuf

La amplificación del gen *tuf* se realizó según el protocolo de Makarova *et al.* (2012). Para la detección de los fitoplasmas se utilizó, en el PCR directo, una mezcla de partidores Tuf340/Tuf890 que amplifican 550 pb. La dilución 1:30 del producto de amplificación del PCR anterior se utilizó en el nested-PCR, realizado con otra mezcla de partidores Tuf400/Tuf835 que amplifican 420-440 pb (Cuadro 2).

Cuadro 2. Partidores para la amplificación del gen *tuf* (Makarova *et al.*, 2012).

Partidores	Secuencia (5'- 3')
Tuf340	Tuf340a GCTCCTGAAGAAARAGAACGTGG
	Tuf340b ACTAAAGAAGAAAAGAACGTGG
	Tuf890ra ACTTGDCCTCTTTCKACTCTACCAGT
Tuf890	Tuf890rb ATTTGTCCCTCTTTCWACACGTCCTGT
	Tuf890rc ACCATTCCCTCTTTC AACACGTCCAGT
	Tuf400a GTAAAACGACGGCCAGTGAAACAGAAAAACGTCA Y TATGCTCA
Tuf400	Tuf400b GTAAAACGACGGCCAGTGAAACTTCTAAAAGACATTACGCTCA
	Tuf400c GTAAAACGACGGCCAGTGAAACATCAAAAAGACAYTATGCTCA
	Tuf400d GTAAAACGACGGCCAGTGAAACAGAAAAAAGACAYTATGCTCA
	Tuf400e GTAAAACGACGGCCAGTCAAACAGCTAAAAGACATTATYCTCA
	Tuf835ra TATACGACTCACTATAGGGAACATCTTCWACHGGCATTAAAGAAAG
Tuf835	Tuf835rb TATACGACTCACTATAGGGAACACCTTCAATAGGCATTAAAAAWG
	Tuf835rc TATACGACTCACTATAGGGAACATCTTCTATAGGTAATAAAAAAGG

Para cada PCR se utilizó un volumen final de 30 μL que contiene los siguientes componentes: 2,5 μL de ADN extraído (20 ng/μL), 1 μL de cada partidor según corresponda (10 μM), 3 μL de buffer PCR (10X), 0,9 μL de MgCl₂ (25 mM), 0,6 μL de dNTP's (10 mM), 21 μL de agua bidestilada y 0,15 μL de enzima Taq polimerasa Platinum (Invitrogen). Posteriormente, estas reacciones se llevaron a un termociclador (Techne TC 3000 6) con incubación de 3 minutos a 94°C, seguido de 35 ciclos que consistieron en las siguientes etapas: desnaturalización de 15 segundos a 94°C; apareamiento de partidores por 30 segundos a 54°C; elongación de 1 minuto a 72°C. La extensión final fue de 72°C durante 7

minutos seguida por una reducción de la temperatura a 4°C por un tiempo indefinido para enfriamiento y conservación de las moléculas de ADN sintetizadas. En ambas reacciones de PCR se utilizó el mismo procedimiento.

Gen 16S rRNA

A través de PCR se realizó la amplificación del gen *16S rRNA* (Deng y Hiruki, 1991; Schaff *et al.*, 1992; Gundersen y Lee, 1996; Smart *et al.*, 1996). Para la detección de fitoplasmas, se utilizaron, en el PCR directo, los partidores universales P1/P7 que amplifican 1819 pb. Luego, se realizó el nested-PCR, previa dilución de 1:30 del producto de amplificación del PCR anterior; para el nested-PCR se usaron los partidores universales R16F2n/R16R2 que amplifican 1250 pb (Cuadro 3).

Cuadro 3. Partidores universales para la detección de gen *16S rRNA*.

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

Cada reacción de PCR se realizó con un volumen final de 27 µL que contiene los siguientes componentes: 2 µL de ADN extraído (20 ng/µL), 0,4 µL de cada partidor según corresponda (nmol/ µL), 2,5 µL de buffer PCR (10X), 0,75 µL de MgCl₂ (50 µM), 0,5 µL de dNTP's (10 µM), 19,2 µL de agua bidestilada y 0,25 µL de enzima Taq polimerasa Platinum (Invitrogen). Estas reacciones se llevaron a cabo en un termociclador (Techne TC 3000 6) con incubación de 1 minuto a 94°C, seguido de 35 ciclos que consistieron en las siguientes etapas: desnaturalización de 1 minuto a 94°C; apareamiento de los partidores por 45 segundos a 53°C (55°C desde el segundo ciclo); elongación de 90 segundos a 72°C. La extensión final fue de 72°C durante 7 minutos seguida por una reducción de la temperatura a 4°C por un tiempo indefinido para enfriamiento y conservación de las moléculas de ADN sintetizadas. Para la reacción del nested-PCR se utilizó el mismo procedimiento que la primera reacción, solo modificando la temperatura de apareamiento de los partidores, utilizando 55°C.

Electroforesis

Se analizó a través de electroforesis los productos de amplificación procedentes de los nested-PCR para ambos genes a estudiar, en gel de agarosa 1,2% utilizando buffer TAE 1X (Tris 40 mM, 20 mM de ácido acético y EDTA 1 mM, pH 8,0). La electroforesis se realizó utilizando una fuente de poder (EPS – 300 IIV) a 110 voltios durante 30 minutos. Los productos de amplificación se visualizaron a través de un transiluminador de luz UV y se fotografiaron utilizando el equipo de fotodocumentación de luz UV. Para la determinación del tamaño de los fragmentos amplificados se utilizó 6 µL de ADN ladder 100 bps (Invitrogen). Los productos de amplificación obtenidos en nested-PCR fueron eluidos del gel de agarosa para su purificación siguiendo el protocolo comercial E.Z.N.A Kit (Omega Biotek).

Clonamiento y secuenciación

Para la reacción de ligamiento se utilizó el Kit pGEM-Teasy Vector®. Se mezclaron 5 µL de tampón, 1 µL de plásmido p-GEM-T, 1 µL de enzima T4 ligasa y 3 µL del DNA purificado en un tubo Eppendorf de 0,2 mL. El tampón y el plásmido se almacenaron a -20°C. Luego, se incubó a 4°C durante toda la noche.

Para la transformación de células competentes de *Escherichia coli* cepa Top 10 con el plásmido se tomó un tubo de células competentes en stock (100 µL) y se descongelaron sobre hielo. Se agregó todo el volumen de la reacción de ligamiento (10 µL) y se homogenizó suavemente, y se mantuvo en frío por 10 minutos. A continuación, se sometió a las células a un shock térmico de 42°C en baño termorregulado durante 2 minutos. Luego, se mantuvo en frío por 1-2 minutos. Se agregó 400 µL de medio de cultivo LB a temperatura ambiente. Se incubó por 1 hora a 37°C agitando a 180-200 rpm. Se centrifugó a 3000 rpm durante 2 minutos a temperatura ambiente, se eliminó 450 µL del sobrenadante y se resuspendieron los 50 µL restantes. Se sembraron en placas Petri con medio selectivo LB enmendado con Carbenicilina (Cb), Estreptomina (Str), Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) y 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido (X-gal), se incubaron a 37°C durante toda la noche. En un tubo Eppendorf de 0,6 mL se agregaron 10 µL de H₂O-BD estéril-DPC y se disolvió una colonia con el plásmido. Posteriormente, se realizó un PCR de colonia usando los partidores SP6 y T7, agregando 1-2 µL de muestra para confirmar la inserción del amplicón en el plásmido. Finalmente, se purificó el resultado de este PCR a partir del gel de agarosa. Para su secuenciación, una vez purificado el ADN de los genes *tuf* y *16S rRNA*, estos se enviaron a Magrogen Corp (USA).

Análisis bioinformático.

Las secuencias se alinearon utilizando los programas BioEdit and CLUSTAL X2 (Thompson *et al.*, 1997; Hall, 1999); el análisis filogenético se realizó utilizando el método de “Minimum Evolution” de MEGA, versión 64.0 (Tamura *et al.*, 2007), para comparar las secuencias nucleotídicas obtenidas, con aquellas de fitoplasmas publicadas en el National Center for Biotechnology Information (NCBI) disponible en internet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). Para completar la identificación se recurrió al análisis del polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) *in silico*.

RESULTADOS

Muestras colectadas

Se muestrearon 168 plantas (Cuadro 4), que presentaban síntomas tales como enanismo, encarrujamiento de hojas, filodia, amarillamientos u otros cambios de color, proliferación y malformación de hojas y flores.

Cuadro 4. Número de muestras obtenidas por Región y especie.

Especie/ Región	Valparaíso	Metropolitana	O'Higgins	Maule	Bío-Bío	Araucanía	Total / especie
Almendro	3	9	7	0	0	0	19
Cerezo	1	5	13	21	8	7	55
Ciruelo europeo	0	8	20	2	0	0	30
Ciruelo Japonés	0	4	8	2	0	0	14
Damasco	1	1	0	0	0	0	2
Duraznero Fresco	1	2	4	0	0	0	7
Duraznero Conservero	8	3	15	1	0	0	27
Nectarino	1	4	9	0	0	0	14
Total/Región	15	36	76	26	8	7	168

Sintomatología y resultados de PCR anidada.

Es importante destacar que todos los huertos de frutales de carozo visitados presentaban al menos una sintomatología que se podría asociar a fitoplasmas según la literatura (Figuras 1 al 4), independiente si estaban infectadas o no por el patógeno. Sin embargo, al analizar los productos de amplificación procedentes de los nested-PCR para el gen *tuf*, solo 9 muestras resultaron positivas (Cuadro 5). Estas muestras corresponden a distintas Comunas de las regiones prospectadas y las sintomatologías observadas son variadas, destacando la presencia de decaimiento generalizado (Figuras 1 y 4).

Figura 1. Árboles de cerezo donde se observa a la izquierda planta infectada por fitoplasmas con ramas muertas y decaimiento general.



Figura 2. Necrosis de floema en planta de cerezo infectada por fitoplasmas.



Figura 3. Epinastía adaxial en hojas en planta de cerezo con presencia de fitoplasmas.



Figura 4. Plantas de duraznero positivas a fitoplasmas con decaimiento generalizado.



Cuadro 5. Muestras positivas al gen *tuf* según el protocolo de Makarova *et al.*, (2012).

Muestra	Especie	Variedad/ Portainjerto	Sintomatología	Comuna Región
10185	Cerezo	Lapins/ Mahaleb	Gran Cantidad de brazos muertos. Algunas ramas con floema necrótico. Además hay síntomas de hongos de la madera. Gomosis abundante. Hojas acucharadas con leves amarilleces. Tronco con deformaciones de corteza.	Calera de Tango Metropolitana
10278	Cerezo	Desconocidos	Epinastía adaxial de hojas. Incompatibilidad injerto – patrón. Algunas hojas con decrecimiento.	Machalí O’Higgins
10282	Almendro	Desconocidos	Escaso crecimiento general. Amarillez de hojas. Incompatibilidad injerto – patrón.	Requínoa O’Higgins
10283	Almendro	Desconocido	Ramas muertas. Necrosis en floema. Escaso crecimiento general. Defoliación. Incompatibilidad injerto – patrón.	Requínoa O’Higgins
10289	Ciruelo	Desconocidos	Escoba de brujas. Clorosis en hojas.	Rancagua O’Higgins
10291	Cerezo	Bing /Colt	Plantas no productivas. Hojas lanceoladas, algunas asimétricas. Necrosis en nervaduras.	Catemu Valparaíso
10319	Duraznero	Fortuna/ Marianna	Encarrujamiento de hojas. Decaimiento y amarillez generalizada.	Los Andes Valparaíso
10344	Cerezo	Stella/ Desconocido	Necrosis de floema. Defoliación total. Negativas a Cáncer bacteriano.	Romeral Maule
10355	Cerezo	Santina/ Van	Necrosis en floema. Ramas muertas. Presencia de cancos.	Romeral Maule

De las 9 muestras anteriores, solo dos resultaron positivas también al gen *16S rRNA*: la 10355, correspondiente a cerezo, el cual presentaba necrosis de floema y canchros; la muestra 10319, que corresponde a un duraznero, y que presentaba encarrujamiento de hojas, amarillez generalizada y decaimiento de la planta (Cuadro 6).

Cuadro 6. Muestras positivas al gen *16S rRNA*.

Muestra	Especie	Variedad	Sintomatología	Comuna / Región
10319	Durazno	Fortuna/ Marianna	Encarrujamiento de hojas. Decaimiento y amarillez generalizada.	Los Andes Valparaíso
10355	Cerezo	Santina/ Van	Necrosis en floema. Ramas muertas. Presencia de canchros (probablemente asociados a la presencia de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>).	Romeral Maule

Para completar la identificación se realizó el análisis bioinformático de las secuencias nucleotídicas de los dos genes. La comparación de las secuencias nucleotídicas de todas las muestras positivas para el gen *tuf* permitió determinar que entre ellas poseen un 100% de identidad, al comparar con las bases de datos del GenBank, se presentó una identidad del 100% con el fitoplasma “sugar beet yellow phytoplasma Hort72”, reportado en Chile y perteneciente al subgrupo ribosomal 16SrIII-J. El cuadro 7 muestra los más altos porcentajes de identidad nucleotídica obtenidos en BLAST, de GenBank, entre los aislados de referencia y el 10319. La secuencia *16S rRNA* de la misma muestra, presentó una identidad de secuencia nucleotídica de 99,84% con tres fitoplasmas pertenecientes al subgrupo ribosomal 16SrIII-J (Cuadro 8).

Cuadro 7. Porcentajes de identidad nucleotídica del gen *tuf*, entre el aislado chileno 10319 correspondiente a duraznero y las referencias disponibles en GenBank.

Descripción	% Identidad	Genbank acc. Number
Sugar beet yellow phytoplasma Hort72 (16SrIII-J, Chile)	100%	KM658259
Goldenrod yellows phytoplasma (16SrIII-D, Estados Unidos)	96,8%	JQ824232
Crepis biennis' yellows phytoplasma (16SrIII-B, Italia)	96,7%	JQ824258

Cuadro 8. Porcentajes de identidad nucleotídica del gen *16S rRNA* entre el aislado de la muestra 10319, correspondiente a duraznero y las referencias disponibles en GenBank.

Descripción	% Identidad	Genbank acc. Number
Solanum lycopersicum' phytoplasma clone TomRed (16SrIII-J, Argentina)	99,84%	KC412031
Chinaberry yellows phytoplasma (16SrIII-J, Bolivia)	99,84%	AF495657
Chayote witches' broom phytoplasma (16SrIII-J, Brasil)	99,84%	AF147706

Tal como se observa en los Cuadros 9 y 10, para el caso del aislado del cerezo (muestra 10355), los porcentajes de similitud nucleotídica son iguales a aquellos encontrados con el aislado obtenido del duraznero.

Cuadro 9. Porcentajes de identidad nucleotídica del gen *tuf* entre el aislado de la muestra 10355 correspondiente a cerezo, y las referencias disponibles en GenBank.

Descripción	% Identidad	GenBank acc. Number
Sugar beet yellow phytoplasma Hort72 (16SrIIIJ-Chile)	100%	KM658259
Goldenrod yellows phytoplasma (16SrIII-D, Estados Unidos)	96,8%	JQ824232
Crepis biennis' yellows phytoplasma (16SrIII-B, Italia)	96,7%	JQ824258

Cuadro 10. Porcentajes de identidad nucleotídica del gen *16S rRNA* entre el aislado de la muestra 10355 correspondiente a cerezo y las referencias disponibles en GenBank.

Descripción	% Identidad	GenBank acc.Number
Solanum lycopersicum' phytoplasma clone TomRed (16SrIII-J, Argentina)	99,84%	KC412031
Chinaberry yellows phytoplasma (16SrIII-J, Bolivia)	99,84%	AF495657
Chayote witches' broom phytoplasma (16SrIII-J, Brasil)	99,84%	AF147706

Una vez alineadas las secuencias se realizó el análisis filogenético para las muestras positivas a los genes *tuf* y *16S rRNA*, utilizando el método “minimum evolution” (Figura 5 y

6). Los árboles filogenéticos obtenidos mediante los genes *tuf* y *16S rRNA*, indican que los aislados de cerezo y duraznero (10355 y 10319, respectivamente), se asocian genéticamente con las referencias pertenecientes al subgrupo ribosomal 16SrIII-J detectado en Chile para diversas especies.

Figura 5. Árbol filogenético obtenido para las secuencias nucleotídica del gen *tuf* de las muestras 10319 y 10355. El aislado de referencia del fitoplasma 16SrIII-J (Hor72) es el único disponible en QBank.

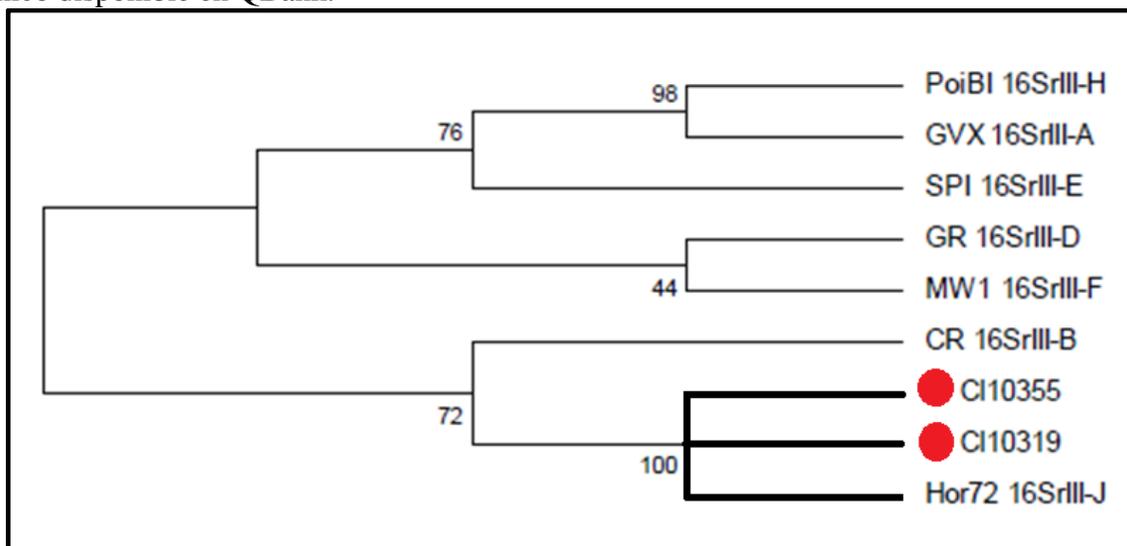
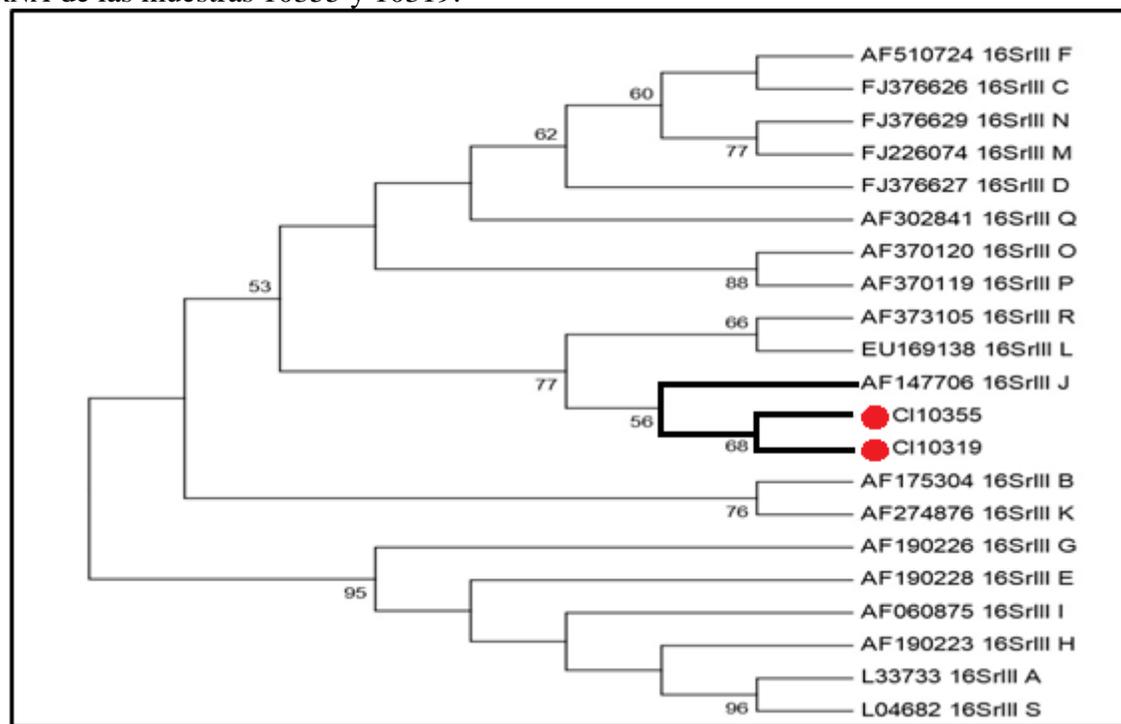


Figura 6. Árbol filogenético obtenido para las secuencias nucleotídica del gen *16S rRNA* de las muestras 10355 y 10319.



Para completar la identificación de los fitoplasmas encontrados en cerezo y duraznero en Chile, se realizó el análisis virtual de RFLP para ambos genes (Figuras 7, 8, 9 y 10). Para el gen *tuf*, la digestión del fragmento de amplificación, al utilizar la enzima de restricción *MseI*, permite asociar de manera inmediata los aislados 10319 y 10355 al fitoplasma del subgrupo ribosomal 16SrII-J (Figura 7). Por otro lado, para el gen *16S rRNA*, los perfiles generados por la digestión de la enzima *HhaI*, resultaron idénticos a 8 de los aislados utilizados para realizar la comparación, incluyendo Cherry 614 (González *et al.*, 2011), perteneciente al subgrupo ribosomal 16SrIII-J (Figura 8). Para refinar esta digestión, se digirió con la enzima *BstUI* (Figura 9), donde solo 3 de los 8 aislados presentaron el mismo patrón de restricción enzimático con los aislados en estudio (Cherry 614, Ch10 y BRWB7). Finalmente, con la enzima *RsaI* (Figura 10) las muestras 10319 (duraznero) y 10355 (cerezo) presentaron un perfil de restricción idéntico a 2 de los aislados de referencia, Cherry 614 y Ch10, los cuales pertenecen al subgrupo ribosomal 16SrIII-J.

Cuadro 11. Porcentaje de identidad nucleotídica de secuencias entre los aislados (gen *16S rRNA*) y los registrados en GenBank.

Aislado	Código de secuencia	Nº GenBank	Subgrupo ribosomal	% identidad
Peach X-disease phytoplasma	CX	L33733	16SrIII-A	99,1
Clover yellow edge phytoplasma	CYE-C	AF175304	16SrIII-B	99,4
Pecan bunch phytoplasma	PB1	FJ376626	16SrIII-C	99,3
Goldenrod yellows phytoplasma	GR1	FJ376627	16SrIII-D	99,5
Spiraea stunt phytoplasma	SP1	AF190228	16SrIII-E	99,3
Milkweed yellows phytoplasma	MW1	AF510724	16SrIII-F	99,5
Walnut witches' broom phytoplasma	WWB	AF190226	16SrIII-G	99,3
Poinsettia branch-inducing phytoplasma	PoiBI	AF190223	16SrIII-H	99,3
Virginia grapevine yellows phytoplasma	VGYIII	AF060875	16SrIII-I	99,3
Chayote witches' broom phytoplasma	ChWBIII (Ch10)	AF147706	16SrIII-J	99,8
Strawberry leafy fruit phytoplasma	SLF	AF274876	16SrIII-K	99,5
Poinsettia exuberant flower-inducing phytoplasma	EF-MM	EU169138	16SrIII-L	99,6
Montana potato purple top phytoplasma	PPT-MT117-1	FJ226074	16SrIII-M	99,2
Alaska potato purple top phytoplasma	PPT-AK6	FJ376629	16SrIII-N	99,0

Dandelion virescence phytoplasma	DanVir	AF370120	16SrIII-O	99,4
Dandelion virescence phytoplasma	DanVir	AF370119	16SrIII-P	99,2
Black raspberry witches'-broom phytoplasma	BRWB7	AF302841	16SrIII-Q	99,6
Cirsium white leaf phytoplasma	CirWL	AF373105	16SrIII-R	99,3
Western peach X-disease phytoplasma	WX	L04682	16SrIII-S	98,9

Figura 7. Análisis virtual en gel de poliacrilamida al 6%, que muestra algunos los perfiles de RFLP digeridos con la enzima *MseI* de los productos secuenciados en nested-PCR del gen *tuf* de aislados de duraznero (10319) y cerezo (10355). Secuencias de fitoplasma utilizadas como referencias (Cuadro 11): GVX (16SrIII-A), PB1 (16SrIII-C), SP1 (16SrIII-E), MW1 (16SrIII-F) y PoiBI (16SrIII-H) Hort72 (16SrIII-J) en comparación con los aislados 10319 y 10355; M: marcador molecular.

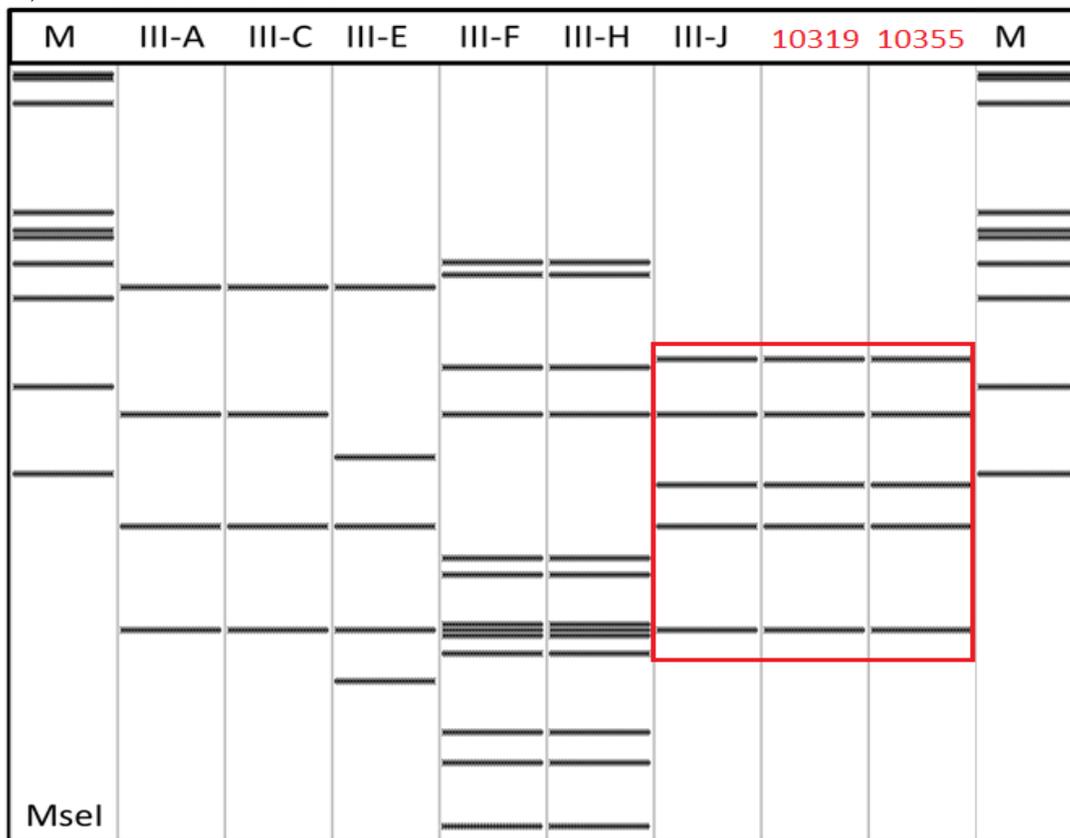


Figura 8. Análisis virtual en gel poliacrilamida al 6% el cual muestra los perfiles de RFLP de los productos secuenciados en nested-PCR del gen *16S rRNA* de aislados de duraznero y cerezo digeridos con la enzima *HhaI*. Secuencias de fitoplasmas utilizadas como referencia en cuadro 11. M: Marcador molecular.

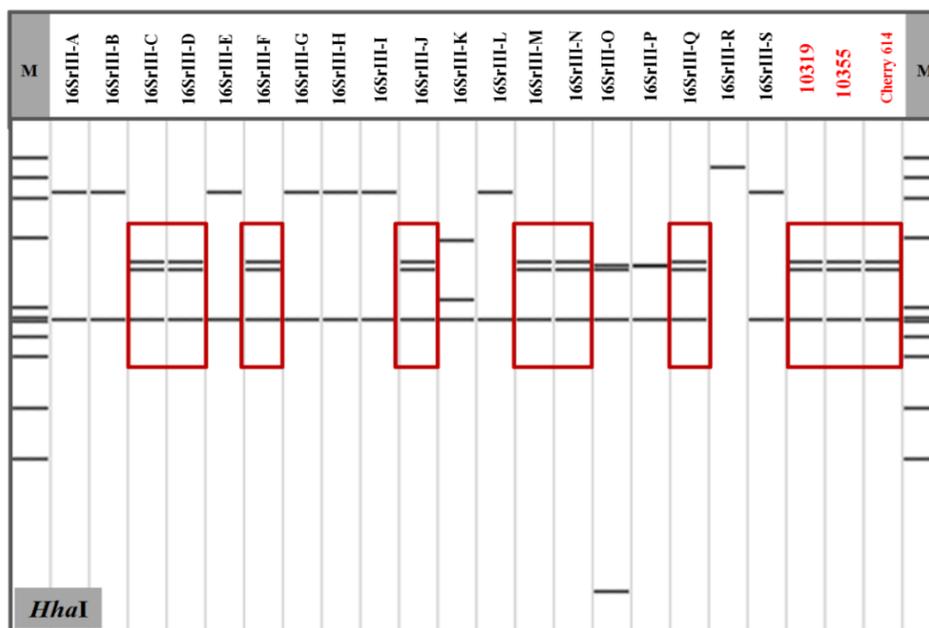


Figura 9. Análisis virtual en gel de poliacrilamida al 6%, el cual muestra los perfiles de RFLP de los productos secuenciados en nested-PCR del gen *16S rRNA* de aislados de duraznero y cerezo, digeridos con la enzima *BstUI*. Secuencias de fitoplasmas utilizadas como referencia en cuadro 11. M: Marcador molecular. X: Indica aislados descartados al realizar la digestión.

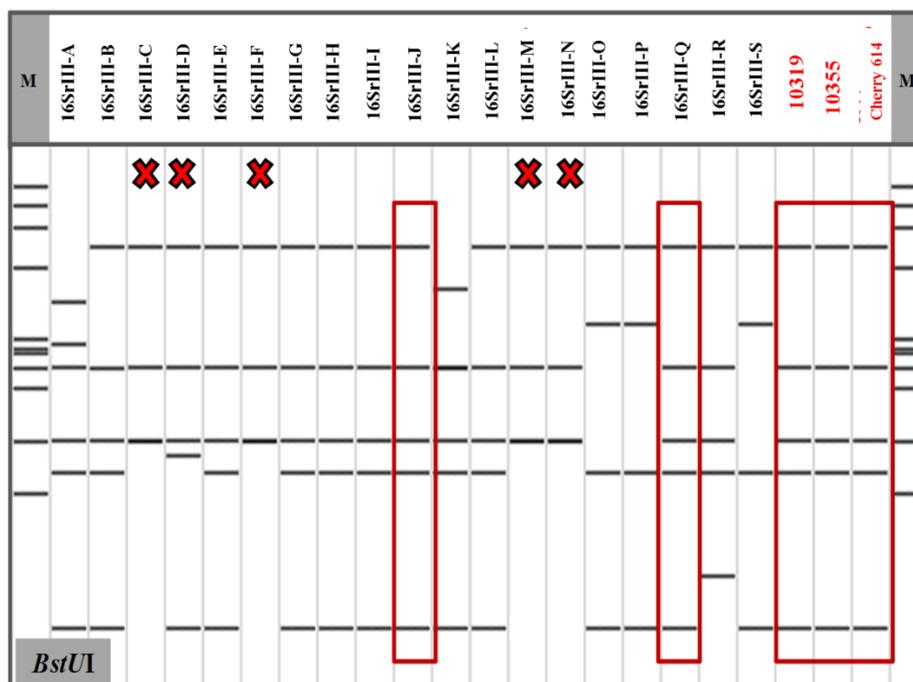
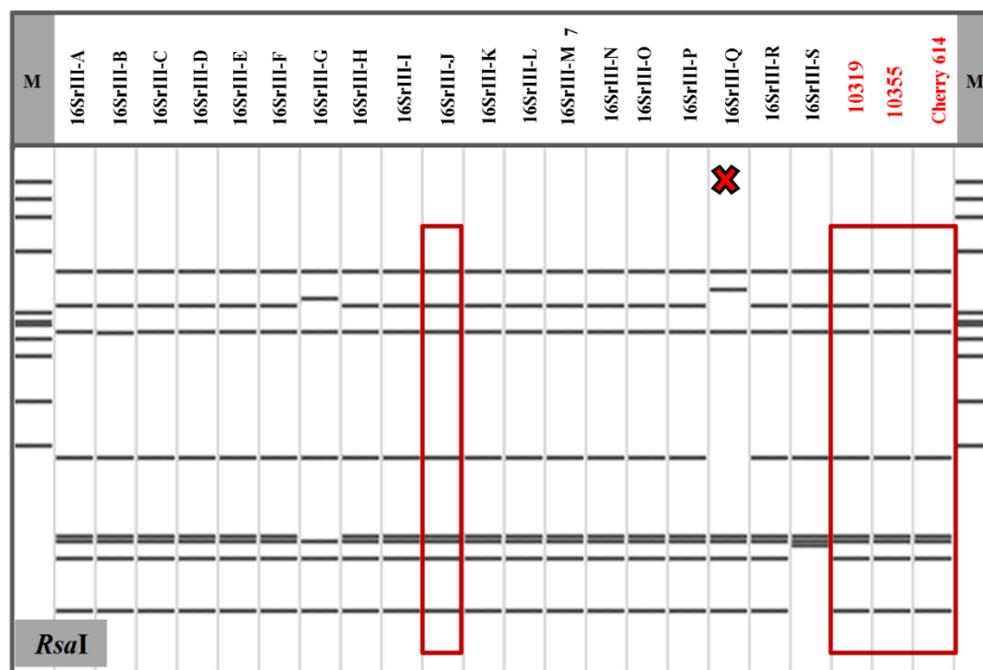


Figura 10. Análisis virtual en gel de poliacrilamida al 6%, el cual muestra los perfiles de RFLP de los productos secuenciados en nested-PCR del gen *16S rRNA* de aislados de duraznero y cerezo, digeridos con la enzima *Bst*UI. Secuencias de fitoplasmas utilizadas como referencia en cuadro 11. X: Indica aislados descartados al realizar la digestión.



DISCUSIÓN

Se colectaron y analizaron 168 muestras, confirmando la presencia de fitoplasmas en frutales de carozo en la principal zona productora, región de Valparaíso, O'Higgins y Maule. Con el gen *tuf* 5,4% de muestras resultó positiva (9 plantas), mientras 1,2% con el gen *16S rRNA* (2 plantas). A pesar de los bajos porcentajes de infección, la situación preocupa porque el material vegetal positivo ha sido encontrado en 4 de las 6 regiones prospectadas. Lo que podría indicar que el patógeno se mueve a través de insectos vectores, de malezas reservorio y/o al uso de material vegetal infectado. Todas las muestras colectadas manifestaban algún tipo de síntomas que, según literatura, se podría asociar a presencia de fitoplasmas (Lee *et al.*, 2000; Musetti *et al.*, 2000). Sin embargo, los resultados de detección de fitoplasmas obtenidos indican que no se debe tratar de síntomas atribuibles solo a fitoplasmas, sino que también a otros agentes de enfermedad, tanto bióticos como abióticos. Por otro lado no se debe olvidar que la carga de fitoplasmas en los tejidos vegetales es muy baja a pesar de los síntomas que estos causan, situación que dificulta su detección (Firrao *et al.*, 2007; Harrison *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 1995; Kawakita *et al.*, 2000). Estos estudios indican que el diagnóstico de una fitoplasmosis, por lo menos en frutales de carozo, nunca se puede basar solo en la observación de los síntomas, sino que debe ser siempre amparado por el resultado de los análisis moleculares.

El fitoplasma 16SrIII-J, se encuentra ampliamente distribuido en Sudamérica en variados huéspedes tanto herbáceos (Guzmán *et al.*, 2014), como leñosos (González *et al.*, 2011). De acuerdo a los resultados obtenidos, los aislados detectados corresponden al mismo fitoplasma infectando plantas de cerezo en la zona central de Chile (González *et al.*, 2011). El fitoplasma 16SrIII-J, además de causar el decaimiento en cerezo, ha sido detectado en Chile también en la vid, ocasionando amarilleces (Fiore *et al.*, 2010). Asimismo, en Chile, el fitoplasma 16SrIII-J se ha reportado regularmente en huertos frutales y otros cultivos como la remolacha como agente causal de la enfermedad denominada “marchitez amarilla de la remolacha” (Fiore *et al.*, 2015), y en malezas como es el caso de *Galega officinalis* L. (Fiore *et al.*, 2015). A lo anterior podemos agregar que el fitoplasma 16SrIII-J en Chile puede ser transmitido a través de los cicadélidos *Paratanus exitiosus* (Fiore *et al.*, 2012) y *Bergallia valdiviana* (Quiroga *et al.*, 2015), los cuales se encuentran distribuidos en diversos cultivos y frutales, asociados además a malezas como galega y correhuela. Por lo tanto, cuando se realiza el desmalezamiento o las malezas se secan durante el periodo de escasez de lluvia, los insectos migran al cultivo de interés agronómico, alimentándose y transmitiendo el fitoplasma. Hay que considerar que estas malezas son comunes en los huertos de frutales de carozos de Chile y Sudamérica, situación que favorece la dispersión del fitoplasma 16SrIII-J, así como ya se describió en el caso de la remolacha en Chile y en vides, y otros cultivos en Sudamérica (Munyanza *et al.*, 2006; Galdeano *et al.*, 2013).

Los fitoplasmas identificados con *tuf* y *16S rRNA* se detectaron en una planta de duraznero y una de cerezo. La primera se encuentra en la Región de Valparaíso y presentaba decaimiento severo, hojas encarrujadas y amarillas. El cerezo en la Región del Maule, manifestando necrosis de floema, brazos muertos y un decaimiento generalizado. El análisis bioinformático permitió determinar que ambos aislados pertenecen al subgrupo ribosomal 16SrIII-J, “X-disease group”. Éste fitoplasma, tal como se comentó anteriormente, se encuentra ampliamente distribuido en Chile tanto en cultivos herbáceos y leñosos. Es importante destacar que se trata de la primera detección del fitoplasma 16SrIII-J en Chile en duraznero. El patógeno puede haber sido introducido al huerto a través de plantas infectadas procedentes de vivero, pero también por insectos vectores. Para aclarar este punto se debería realizar un estudio epidemiológico en el huerto mismo, considerando ampliar el muestreo de plantas de duraznero, coleccionar, identificar y analizar también a las malezas e insectos presentes.

Para el control de fitoplasmas en general es aconsejable partir siempre por una correcta identificación, a la cual debe seguir el manejo agronómico basado en el criterio de la prevención de la infección a través del uso de material vegetal sano, a la eliminación de malezas reservorio y de insectos vectores. La distribución de los fitoplasmas aparentemente se relaciona con la existencia de plantas hospederas y de insectos vectores, los cuales cumplen un rol importante en la diseminación. Por esta razón, es necesario disponer de informaciones acerca de la epidemiología del agente infeccioso. Más aún cuando los datos indican que las enfermedades causadas por fitoplasmas en el mundo (se han reportado varias especies de fitoplasmas distribuidos en 98 familias botánicas en 85 países), muestran un aumento en su incidencia, siendo incluso factores limitantes para la producción de varios cultivos (McCoy *et al.*, 1989; Costanzo, 2012).

CONCLUSIONES

Con este trabajo se prospectó la principal zona productora de frutales de carozo colectando 168 muestras, las cuales fueron representativas de cada región según superficie plantada. Además señalar que todas las muestras recolectadas presentaban al menos un síntoma asociado a presencia de fitoplasmas. Lo anterior podría indicar que los síntomas observados no solo dependen de la presencia de fitoplasmas sino que de la acción de otros agentes de enfermedad bióticos o abióticos.

Los resultados obtenidos señalan la presencia del fitoplasma 16SrIII-J en huertos de frutales de carozo.

El estudio informa la primera detección del fitoplasma 16SrIII-J en duraznero al que se asocia decaimiento general de las plantas, muerte de ramas y necrosis de floema. Por otro lado se confirma la presencia del 16SrIII-J en cerezo.

A través de este estudio no se detectó en Chile el “European stone fruit yellows” (ESFY, '*Ca. P. prunorum*') y el “peach X-disease” (*Ca. P. pruni*), fitoplasmas responsables de graves enfermedades en frutales de carozo, respectivamente en Europa y Estado Unidos.

A la luz de estos resultados, se sugiere desarrollar en Chile el control del material de propagación de cerezo y duraznero para limitar la diseminación del fitoplasma 16SrIII-J.

LITERATURA CITADA

- Arismendi, N.; Andrade, N.; Riegel, R.; Carrillo, R. 2010. Presence of a phytoplasma associated to “witches’ broom” disease in *Ugni molinae* Turcz. and *Gaultheria phillyreifolia* (Pers.) Sleumer determined by DAPI, PCR and DNA sequencing. Chilean Journal of Agricultural Research 70: 26-33.
- Camarena, G., y De la Torre, R. 2008. Fitoplasmas: Síntomas y Características Moleculares. Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente 14 (2): 81 – 87.
- Christens, N. M., Axelsen, K. B., Nicolaisen, M., Schulz, A. 2005. Phytoplasmas and their interactions with hosts. TRENDS in Plant Science 10: 526-535.
- CIREN - ODEPA. 2015. Catastro Frutícola: Principales resultados, Julio 2015. Centro de Información de Recursos Naturales (CIREN) y Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA). 53 pp.
- Costanzo, S., 2012. New Pest Response Guidelines, in: Robert E. Davis (Ed.), Selected 'Candidatus Phytoplasma spp.' of Apple, Grape and Peach The U.S. Department of Agriculture, pp. 1-210.
- Deng, S., and Hiruki, C. 1991. Amplification of 16s rRNA genes from culturable and nonculturable mollicutes. Journal of Microbiological Methods 14: 53-61.
- Fiore, N., González, X., Zamorano, A., Quiroga, N., Paillalef, R., Pino, A. M. 2015. Phytoplasmas associated with “yellow wilt disease of sugar beet” in Chile. Phytopathogenic Mollicutes 5 (1): S63-S64.
- Fiore, N., Longone, V., González, F., Zambrano, A., Pino, A. M., Araya, J., Paltrinieri, S., Bertaccini, L., Alma, A., y Contaldo, N. 2012. Transmission of 16SrIII-J phytoplasma by *Paratanus exitiosus* Leafhopper. Proceedings of the 17th Congress of ICSVG: 230-231. Davis, California, USA.
- Fiore, N., Zamorano, A., González, F., Pallas, V., Sánchez – Navarro, J., Rosales I. M., Peña, E., Rivera, L., y Pino, A. M. 2010. Virus y viroides en frutales de Carozos en Chile. Simiente 80 (3-4) 1-178; 2010.
- Firrao, G. , Garcia-Chapa, M. , Marzachi, C. 2007. Phytoplasmas: genetics, diagnosis and relationships with the plant and insect host. Frontiers in Bioscience : a Journal and Virtual Library. Volume 2:1353-1375.
- Gajardo, A., Fiore, N., Prodan, S., Paltrinieri, S., Botti, S., Pino, A. M., Zamorano, A., Montealegre, J., Bertaccini A. 2009. Phytoplasmas associated with grapevine yellows disease in Chile. Plant Disease 93: 789-796.

- Galdeano E., Guzmán F., Fernández F., Conci L. 2013. Genetic diversity of 16SrIII group phytoplasmas in Argentina. Predominance of subgroups 16SrIII-J and B and two new subgroups 16SrIII-W and X. *European Journal of Plant Pathology* 137(4): 753-764.
- González, F., Zamorano, A., Pino, A. M., Fiore, N. 2011. Identification of phytoplasma belonging to X-disease group in cherry in Chile. *Bulletin of Insectology* 64 (Supplement): S235-S236, 2011.
- Gundersen, D. E., and Lee, Y. M. 1996. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primers pairs. *Phytopathol. Mediterr.* 35: 144-151.
- Guzmán, F., Giolitti F, Fernández F, Nome C, Lenardon S, Conci L. 2014. Identification and molecular characterization of a phytoplasma associated with sunflower in Argentina. *European Journal of Plant Pathology*, 138: 679-683.
- Hall, T. A. 1999. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Serie N° 41*:95-8.
- Harrison, N., Narváez, M., Almeyda, H., Cordova, I., Carpio, M., and Oropeza C. 2002. First report of group 16SrIV phytoplasmas infecting coconut palms with leaf yellowing symptoms on the Pacific coast of Mexico. *Plant Pathology*. Volume 51, Issue 6, page 808.
- Hogenhout, S., Oshima, K., Ammar, E., Kakizawa, S., Kingdom, N., and Namba, S. 2008. Phytoplasmas: bacteria that manipulate plants and insects. *Molecular Plant Pathology*, 9(4): 403-423.
- Kawakita, H., Saiki, T., Wei, W., Mitsuhashi, W., Watanabe, K., and Sato, M. 2000. Identification of Mulberry Dwarf Phytoplasmas in the Genital Organs and Eggs of Leafhopper *Hishimonoides sellatiformis*. *Phytopathology*. Volume 90, Number 8. Pages 909-914
- Lee, I., Davis, R., y Gundersen-Rindal, D. 2000. Phytoplasma: Phylogenic Mollicutes. *Annual Review of Microbiology* 54: 221-255.
- Makarova, O., Contaldo, N., Arenas, S., Kawube, G., Bertaccini, A., and Mogens, N. 2012. DNA Barcoding for Identification of ‘*Candidatus* Phytoplasmas’ Using a Fragment of the Elongation Factor Tu Gene. *PLoS ONE* 7(12): e52092.
- McCoy, R., Caudwell, A., Chang, C., Chen, T., Chykowski, L., Cousin, M., Dale, J., de Leeuw, J., Golino, D., Hackett, K., Kirkpatrick, B., Marwitz, R., Petzold, H., Sinha, R., Sugiura, M., Whitcomb, R., Yang, Y., Zhu, B., y Seemüller, E. 1989. Plant diseases associated with mycoplasma-like organisms. Pp 546-640. En: Whitcomb, R. y Tully, J. (eds.). *The Mycoplasmas Vol. V* Academic Press New York.
- Munyaneza, J. E., Crosslin, J. M., y Upton, J. E. 2006. Beet leafhopper (Hemiptera: Cicadellidae) transmits the Columbia Basin “potato purple top” phytoplasma to potatoes, beets, and weeds. *Journal of Economic Entomology* Vol. 99, Issue 2: 268 – 272.

- Musetti, R., Favali, M. A., Pressacco, L. 2000. Histopathology and polyphenol content in plants infected by phytoplasmas. *Cytobios* 102, 133-147.
- Paltrinieri, S., Botti, S., Dal Molin, F., Mori, N., Fiore, N., Bertaccini, A. 2006. Are phytoplasmas involved in a severe peach decline? *Acta Horticulturae* 713: 421-426.
- Prince, J. P., Davis, R. E., Wolf T. K., Lee. I. M., Mogen, B.D., Dally, E.L., Bertaccini, A., Credi R., and Barba, M., 1993. Molecular detection of diverse mycoplasma-like organisms (MLOs) associated with grapevine yellows and their classification with aster yellows, X-disease, and elm yellows MLOs. *Phytopathol.*83:1130-1137.
- Quiroga, N., González, X., Zamorano, A., Pino, A. M., Picciau, L., Alma, A., Paltrinieri, S., Contaldo, N., Bertaccini, A., Fiore, N. 2015. Transmission of 16SrIII-J phytoplasma by *Bergallia valdiviana* Berg 1881 leafhopper. *Phytopathogenic Mollicutes* 5(1-S): S47-S48.
- Schaff, A., Lee, M., Davis, E. 1992. Sensitive detection and identification of mycoplasma-like organisms by polymerase chain reaction. *Biochemistry Biophysics Research Communications* 186: 1503-1509.
- Smart, C. D., Schneider, B., Blomquist, C. L., Guerra, L. J., Harrison, N. A., Ahrens, U., Lorenz, K. H., Seemuller, E., and 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.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., and Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599.
- Thompson J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., and Higgins, D.G. 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 25: 4876-4882.
- Yu, Y. L., Yeh, K.W., Lin, C. P. 1998. An antigenic protein gene of a phytoplasma associated with sweet potato witches broom. *Microbiology* 144, 1257- 1262.