

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Caracterización molecular y epidemiología de
fitoplasmas pertenecientes al grupo 16Sr XIII
(*Mexican periwinkle virescence group*; MPV) presentes
en la Argentina**

por

Biol. Franco Daniel Fernández

Director: Luis Rogelio Conci

Instituto de Patología Vegetal IPAVE

Centro de Investigaciones Agropecuarias (CIAP-INTA)



FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

Córdoba, Argentina

2015

COMISIÓN ASESORA

Dr. Luis Rogelio Conci, Instituto de Patología Vegetal IPAVE (CIAP-INTA)

Dr. Julio Daniel Edelstein, EEA Manfredi (INTA)/Universidad Nacional de Córdoba

Dra. Marisa Diana Farber, Instituto de Biotecnología (CICVyA-INTA)

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y Fecha:

Calificación:

TRIBUNAL

Firma:

Aclaración:

Firma:

Aclaración:

Firma:

Aclaración:

A Estela, Fernando y Natalia por su eterno amor.

Agradecimientos

Quiero empezar agradeciendo a mi director Luis Conci, por acompañarme y guiarme durante todo el desarrollo de mi doctorado tanto en lo académico como en lo personal. Agradezco su paciencia, sus consejos, su amistad y sobre todo por propiciar ámbitos de discusión constructivas en cada una de las etapas de mi tesis.

Agradezco también, a mis amigos de laboratorio, Fany, Amalia, Natalia, Tomás, Laura por su eterna paciencia, su cariño, sus palabras de aliento, su tolerancia, sus risas y por sobre todo por hacer de nuestro laboratorio un lugar especial.

A mis amigos Lorena y Gaston, por su amor y respeto incondicional.

A Edgardo, Naty P, Vero R, Vero T, Vero B, Evi, Anita, Fernanda, Germán, Nacira, Marianela, Humberto, Eze, Florencia A, Bety, Nancy, Walter, Rodolfo, Nacho, Matías, Nicolás, Rodrigo, Gisella, Marcos, Pablo, Gaby, Paulita, Paola, Daniela, Daniel C, por brindarme su cariño y su complicidad en tantos momentos.

Agradezco a mis amigos de la vida por estar siempre apoyándome en cada momento

A Cinthia, por haberme acompañado en gran parte de este proceso, por su amor, su paciencia y sus consejos.

Le agradezco a Vilma Conci y Alejandro Rago, por su apoyo permanente en cada una de las etapas de mi doctorado.

Agradezco al INTA, por confiar en mí, por permitirme desarrollar mi labor científica en un ámbito propicio para la construcción del conocimiento.

Agradezco profundamente también, haber podido formar parte de una etapa de nuestra historia como país, en la que la ciencia y la tecnología son consideradas como pilares fundamentales tanto para el desarrollo y como para la construcción de nuestra nación.

Agradezco a Nathalie, su amor y su complicidad, sus consejos, sus risas y por hacer que todo parezca más fácil a su lado.

Agradezco a Fernando, Estela y Natalia, mi familia, por amarme y valorarme, por acompañarme y por hacerme sentir que cada una de las decisiones que he de tomar en mi vida serán siempre abrazadas con amor y respeto.

Publicaciones derivadas de la tesis:

-Fernández FD, Conci VC, Kirschbaum and Conci LR. (2013b). Molecular characterization of a phytoplasma of the ash yellows group occurring in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) plants in Argentina. *Eur J Plant Pathol*, 135, 1–4.

-Fernández FD, Meneguzzi N, Guzmán FA, Kirschbaum D, Vilma VC, Nome C and Conci LR. (2015). Detection and identification of a novel 16SrXIII subgroup phytoplasma associated with strawberry red leaf disease in Argentina. *Int J Syst Evol Microbiol* in press DOI 10.1099/ij.s.0.000276.

Índice

| | |
|--|-----------|
| Abreviaturas | 1 |
| Resumen..... | 2 |
| Abstract | 3 |
| Capítulo I | 5 |
| Introducción: Generalidades de los Fitoplasmas | 5 |
| 1. Características de los fitoplasmas | 6 |
| 1.1 Morfología y ubicación de los fitoplasmas en el huésped | 6 |
| 1.2 Sintomatología ocasionada por fitoplasmas | 7 |
| 1.3 Mecanismos de transmisión de los fitoplasmas | 9 |
| 1.4 Filogenia y taxonomía en fitoplasmas..... | 11 |
| 1.5 El genoma de los fitoplasmas..... | 16 |
| 1.6 Mecanismos de interacción fitoplasma-hospedante: proteínas inmunodominantes de membrana | 19 |
| 1.7 Detección de fitoplasmas | 22 |
| 1.8 Importancia fitosanitaria de los fitoplasmas..... | 24 |
| 1.9 Enfermedades causadas por fitoplasmas en Argentina | 25 |
| 1.10 Fitoplasmas del grupo 16SrXIII (<i>Mexican Periwinkle Virescence</i>), características e importancia en la región | 27 |
| 2. Hipótesis..... | 29 |
| 2.1 Referidas a la caracterización epidemiológica | 29 |
| 2.2 Referidas a la caracterización molecular | 29 |
| 3. Objetivos generales..... | 30 |
| 3.1 Referidos a la caracterización epidemiológica | 30 |
| 3.2 Referidos a la caracterización molecular | 30 |

| | |
|--|----|
| 4. Objetivos específicos..... | 30 |
| 4.1 Referidos a la caracterización epidemiológica | 30 |
| 4.2 Referidos a la caracterización molecular | 31 |
| Capítulo II | 32 |
| Caracterización epidemiológica de fitoplasmas asociados al cultivo de la frutilla (<i>Fragaria x ananassa</i> D.)..... | 32 |
| 1. Introducción | 33 |
| 2. Materiales y métodos | 36 |
| 2.1 Recolección de material sintomático a campo | 36 |
| 2.2 Ensayos de transmisión experimental mediante <i>Cuscuta subinclusa</i> y mediante injerto del foliolo medio | 36 |
| 2.3 Extracción de ADN total | 37 |
| 2.4 Determinación de la calidad del ADN: prueba de inhibición | 38 |
| 2.5 Detección de fitoplasmas mediante PCR en plantas de frutilla con sintomatología de <i>EL</i> (Enrojecimiento Letal): condiciones y <i>primers</i> empleados..... | 38 |
| 2.6 Identificación preliminar de fitoplasmas mediante PCR-RFLP | 40 |
| 2.7 Muestreos en lotes de producción de frutilla en Lules (Tucumán) | 41 |
| 2.8 Análisis estadístico | 42 |
| 3. Resultados | 44 |
| 3.1 Recolección de material sintomático a campo | 44 |
| 3.2 Ensayos de trasmisión experimental..... | 45 |
| 3.3 Extracción de ADN total y prueba de inhibición | 45 |
| 3.4 Detección de fitoplasmas en plantas con sintomatología <i>EL</i> (Enrojecimiento Letal) mediante PCR <i>nested</i> | 46 |
| 3.5 Identificación preliminar de fitoplasmas mediante PCR-RFLP | 47 |
| 3.6 Análisis de la incidencia y prevalencia de la enfermedad <i>EL</i> en lotes productivos de Lules..... | 51 |

| | |
|--|----|
| 4. Discusión | 57 |
| Capítulo III | 63 |
| Caracterización epidemiológica del fitoplasma <i>China tree yellows</i> (16SrXIII-C): Análisis de su distribución en Argentina..... | 63 |
| 1. Introducción | 64 |
| 2. Materiales y Métodos | 69 |
| 2.1 Recolección de muestras de paraíso (<i>Melia azedarach</i> L.) con sintomatología de declinamiento..... | 69 |
| 2.2 Detección de fitoplasmas en muestras sintomáticas de paraíso mediante PCR del gen 16Sr DNA | 69 |
| 2.3 Identificación de los diferentes fitoplasmas mediante PCR-RFLP del gen 16S rDNA.... | 70 |
| 2.4 Ensayos de transmisión a ejemplares de paraíso sano y vinca sana en condiciones controladas..... | 70 |
| 3. Resultados | 71 |
| 3.1 Recolección de muestras de paraíso (<i>Melia azedarach</i> L.) con sintomatología de declinamiento en distintas regiones de la Argentina..... | 71 |
| 3.2 Detección e identificación del fitoplasma ChTYXIII mediante PCR y PCR-RFLP | 72 |
| 3.3 Análisis de los patrones de distribución..... | 73 |
| 4. Discusiones | 79 |
| Capítulo IV | 82 |
| Inmunolocalización del fitoplasma <i>China tree yellows</i> | 82 |
| 1. Introducción | 83 |
| 2. Materiales y métodos | 87 |
| 2.1 Amplificación del segmento interno del gen de la proteína secA..... | 87 |
| 2.2 Clonado del fragmento amplificado en el vector pBluescript SK (II) +..... | 87 |
| 2.3 Análisis de la secuencia | 88 |
| 2.4 Expresión de la proteína recombinante en un sistema procariota..... | 88 |

| | |
|---|-----|
| 2.5 Purificación de la proteína recombinante..... | 89 |
| 2.6 Sensibilización de conejos con la proteína recombinante secA purificada..... | 91 |
| 2.7 Prueba de la sensibilidad y especificidad de los sueros obtenidos..... | 92 |
| 2.8 Evaluación del suero frente tejido de planta mediante NC-ELISA | 92 |
| 2.9 Evaluación del suero mediante Inmunohistoquímica | 93 |
| 3. Resultados | 96 |
| 3.1 Clonado y secuenciación de un fragmento de 840pb de la proteína secA | 96 |
| 3.2 Análisis de la secuencia | 97 |
| 3.3 Expresión de la proteína recombinante en un sistema procariota..... | 98 |
| 3.4 Purificación de la proteína recombinante: solubilización de cuerpos de inclusión y purificación mediante electroelución | 99 |
| 3.5 Sensibilización de conejos con la proteína recombinante secA purificada..... | 100 |
| 3.6 Evaluación del suero S7 mediante NC-ELISA contra tejido de planta infectado..... | 101 |
| 3.7 Evaluación de la reactividad del suero S7 mediante inmunohistoquímica..... | 101 |
| 4. Discusión | 107 |
| Capítulo V | 109 |
| Caracterización molecular de fitoplasmas asociados al patosistema <i>EL</i> de frutilla en Argentina | 109 |
| 1. Introducción | 110 |
| 2. Materiales y métodos | 113 |
| 2.1 Obtención de aislamientos..... | 113 |
| 2.3 Clonado y secuenciación del gen 16Sr DNA | 113 |
| 2.4 Análisis de las secuencias | 115 |
| 3. Resultados | 117 |
| 3.1 Aislamientos secuenciados | 117 |
| 3.2 Análisis de las secuencias | 118 |

| | |
|--|-----|
| 3.3 Análisis filogenético..... | 126 |
| 4. Discusión | 130 |
| Capítulo VI | 136 |
| Caracterización molecular de aislamientos del fitoplasma <i>China tree yellows</i> (16SrXIII-C) presentes en la Argentina | 136 |
| 1. Introducción | 137 |
| 2. Materiales y métodos | 142 |
| 2.1 Obtención de aislamientos..... | 142 |
| 2.2 Clonado y secuenciación de los genes 16Sr DNA, genes rplV-rpsC y secA..... | 142 |
| 2.3 Análisis de las secuencias | 144 |
| 2.4 Caracterización molecular de regiones genómicas relacionadas con mecanismos de interacción: proteínas inmunodominantes de membrana (IDPs)..... | 146 |
| 3. Resultados | 150 |
| 3.1 Amplificación mediante PCR | 150 |
| 3.2 Prueba de especificidad del juego de <i>primers</i> secA-ChTYFw1/secA-ChTYRv1..... | 151 |
| 3.3 Ligación, transformación y selección de clones transformantes | 151 |
| 3.4 Ensamblaje de las secuencias..... | 152 |
| 3.5 Análisis de las secuencias de los genes 16S rDNA, rplV-prsC y secA..... | 152 |
| 3.6 Análisis de regiones relacionadas con mecanismos de patogenicidad: genes <i>imp</i> y <i>amp</i> | 162 |
| 4. Discusión | 176 |
| Conclusiones Finales | 181 |
| Patosistema enrojecimiento letal de la frutilla-fitoplasmas | 181 |
| Patosistema amarillamiento del paraíso-fitoplasmas..... | 182 |
| Esquemas Conceptuales..... | 185 |
| Patosistema enrojecimiento letal de la frutilla | 185 |

| | |
|---|-----|
| Patosistema amarillamiento del paraíso..... | 189 |
| Bibliografía | 193 |
| Anexo | 214 |
| Tablas | 214 |
| Condiciones de PCR..... | 225 |

Abreviaturas

| | |
|-------------------|--|
| DNA | ácido desoxirribonucleico |
| RNA | ácido ribonucleico |
| grupo 16Sr | grupo taxonómico definido por patrones de restricción RFLP |
| MLO | <i>mycoplasma-like organism</i> |
| PCR | <i>Polymerase chain reaction</i> |
| RFLP | <i>Restriction fragment length polymorphism</i> |
| CTAB | bromuro de hexadeciltrimetil-amino |
| EDTA | ácido etilen diamino tatraacético |
| TAE | Tris-acetato-EDTA |
| TBE | Tris-borato-EDTA |
| UV | ultra violeta |
| min | minuto |
| seg | segundo |
| kb | kilobase nucleotídica |
| pb | par de bases nucleotídicas |
| μL | microlitro |
| vol | volumen |
| rpm | revoluciones por minuto |
| mM | milimolar |
| mL | mililitro |
| g | gramo |
| ng | nanogramo |

Resumen

En la presente tesis se caracterizaron epidemiológica y molecularmente, fitoplasmas pertenecientes al grupo 16SrXIII o Mexican periwinkle virescence (MPV) presentes en la Argentina. Se trabajó sobre los patosistemas enrojecimiento letal de la frutilla y amarillamiento del paraíso. Desde el punto de vista epidemiológico, en el patosistema enrojecimiento letal de la frutilla, se determinó que la proporción (incidencia) de plantas con enrojecimiento letal (EL) está estadísticamente relacionados con los cultivares implantados y el origen de los mismos (viveros). También fue posible relacionar estadísticamente la presencia de la enfermedad EL, con la presencia de fitoplasmas, y se demostró que esta solo puede explicar el 12.08% de los casos. A su vez se logró identificar fitoplasmas de 3 grupos 16Sr distintos (16SrIII, 16SrVII y 16SrXIII) asociados al EL. Dentro de estos grupos, se identificaron fitoplasmas pertenecientes a los subgrupos 16SrIII-J, 16SrIII-X, 16SrVII-C previamente descritos en nuestro país, y el subgrupo 16SrXIII-F, descrito por primera vez en esta tesis. El análisis de las relaciones filogenéticas de estos subgrupos, evidenciaron un parentesco cercano con fitoplasmas de la región Sudamericana, por lo que posiblemente estén siendo dispersados por vectores, de manera local. Por otro lado se detectó por primera vez la presencia del subgrupo 16SrXIII-A en Argentina, el cual solo ha sido reportado en países productores de plantas madres de frutilla (USA), por lo que se presume que el mismo ha ingresado como producto de la comercialización entre ambas regiones. Respecto al patosistema amarillamiento del paraíso fue posible determinar con precisión la distribución geográfica del fitoplasma *China tree yellows* ChTYXIII (16SrXIII-C), demostrándose la presencia del mismo solo en la región del nordeste Argentino (Chaco, Formosa, Misiones y norte de Corrientes). El análisis de los genes 16SrDNA, rpLV-rpsC y secA en distintos aislamientos geográficos del ChTYXIII permitió determinar que dicho patógeno presenta todas las condiciones para ser considerado como una nueva especie de fitoplasma denominada ‘*Candidatus Phytoplasma meliae*’. Se generó un antisuero policlonal específico en contra de la proteína secA, el cual permitió localizar al ‘*Candidatus Phytoplasma meliae*’ mediante inmunohistoquímica y detectarlo de manera específica. A su vez, se logró poner a punto un sistema de detección específico de dicho patógeno mediante PCR con cebadores generados a partir de secuencias del gen secA. Por último, se caracterizó molecularmente la proteína inmunodominante de

membrana del tipo *amp* del ‘*Candidatus Phytoplasma meliae*’. Dicha proteína presenta una región central hidrofílica y dos regiones transmembrana ubicadas en los extremos C-terminal y N-terminal. El análisis de identidad de las distintas regiones, reveló que la región central hidrofílica es altamente diversa, y está sometida a una presión de selección positiva. Estos resultados sugieren la participación de dicha proteína en mecanismos de interacción patógeno-hospedante.

Abstract

In this thesis a molecular and epidemiological characterization of phytoplasmas belonging to the 16SrXIII or Mexican periwinkle virescence group present in Argentina was performed. Work was conducted on strawberry lethal redness and chinaberry yellowing pathosystems. From an epidemiological point of view, in the pathosystem strawberry lethal redness it was determined that both used cultivars and origin (nurseries), are statistically related to the ratio (incidence) of plants with lethal redness (EL). It was also possible to statistically relate the presence of EL disease, with the presence of phytoplasma, and this can explain the 12.08% of cases only. Was also achieved the identification of three different 16Sr phytoplasma groups (16SrIII, 16SrVII and 16SrXIII) associated to EL. Within these groups, subgroups 16SrIII-J, 16SrIII-X, 16SrVII-C were identified (already described in our country), and 16SrXIII-F, described in this thesis for the first time. Phylogenetic analyzes of these subgroups show a closer relationship with South American reported phytoplasmas, so these probably may be dispersed by vectors locally. Also, was detected the presence, for the first time, of 16SrXIII-A subgroup in Argentina, which has been only reported in the strawberries mother plants production countries (USA), thus it's presumed that this phytoplasma subgroup has been entered as a product of the commercialization between both regions. Regarding to chinatree yellowing pathosystem, it was possible determine accurately the geographical distribution of *China tree yellows* phytoplasma ChTYXIII (16SrXIII-C), showing the presence of this pathogen only in the Argentinean Norwest region (Chaco, Formosa, Misiones, and north of Corrientes provinces). With regard to molecular characterization, the analyses of 16S rDNA, rplV-rpsC and secA genes in different geographical isolates of ChTYXIII, shows that this pathogen has all the conditions to be

consider as new phytoplasma specie named '*Candidatus Phytoplasma meliae*'. Also, a specific policlonal antibody against secA protein was generated, which allowed specifically detect and locate the '*Candidatus Phytoplasma meliae*' by immunohistochemistry. Moreover, it was developed a specific detection system of '*Candidatus Phytoplasma meliae*' by PCR based in secA DNA sequence. Finally, the immunodominant membrane protein amp type from '*Candidatus Phytoplasma meliae*' was molecularly characterized. This protein has a hydrophilic central region and two transmembrane regions located in the C-terminal and N-terminal fragments. The identity between this regions shows that the hydrophilic central region is highly diverse and is subjected to a positive selection pressure. These results suggest the involvement of this protein in mechanisms of host-pathogen interaction.

Capítulo I

Introducción: Generalidades de los Fitoplasmas

1. Características de los fitoplasmas

Los fitoplasmas son bacterias carentes de pared celular de vida parasítica, provistos de genomas pequeños ricos en A+T, además de ser miembros no helicodales de la clase *Mollicutes* y responsables de enfermedades en numerosas especies vegetales (Lee et al., 2000; Hogenhout et al., 2008; Oshima et al., 2013). Durante mucho tiempo, dado que se carecía de métodos de diagnóstico eficaces, se consideró a los virus como los agentes causales de numerosas enfermedades del tipo amarillamiento debido a la propagación infecciosa, la sintomatología y la dispersión mediada por insectos. Sin embargo, en 1967 Doi y col. (1967) pudieron demostrar la asociación entre este tipo de enfermedades y organismos similares a bacterias. Por observación de cortes ultra finos al microscopio electrónico de transmisión, descubrieron cuerpos pleomórficos carentes de pared celular en tubos cribosos de plantas afectadas por enfermedades tipo amarillamiento. La apariencia morfológica y ultra estructural de los microorganismos era similar a los micoplasmas conocidos como patógenos de animales. Por ello se los llamó en un principio organismos tipo micoplasmas (MLOs, mycoplasma like organisms) y no fue sino hasta el año 1994 que se los comenzó a llamar Fitoplasmas (International Committee on Systematic Bacteriology Subcommittee on the Taxonomy of *Mollicutes*, 1993).

1.1 Morfología y ubicación de los fitoplasmas en el huésped

Los fitoplasmas se caracterizan por que sus células están delimitadas por una única membrana plasmática, sin pared celular (Doi et al., 1967). En observaciones llevadas a cabo mediante microscopía electrónica se los pueden identificar como estructuras del tipo pleomórficas con tamaños que varían entre 200 a 800 μ m (Figura 1.1), aunque también se ha registrado la presencia de formas filamentosas las cuales son especialmente abundantes durante los primeros estadios de infección (Lee y Davis, 1992). Además, se ha demostrado en cortes seriales (Florange y Cameron, 1978) observados con microscopio electrónico de barrido (Haggis y Sinha, 1978), que los fitoplasmas también pueden adquirir formas ramificadas.

Dentro de las plantas que actúan como hospedantes se alojan en los elementos cribosos del floema (raramente en las células parenquimáticas) (Doi et al., 1967;

Whitcomb y Tully, 1989), en donde se cree que se multiplican y propagan (Christensen et al., 2005) ya que estas células son anucleadas y con poco citoplasma, lo que reduce notablemente la resistencia al movimiento. Los fitoplasmas se transportan entre célula y célula del floema a través de los poros de los elementos cribosos. En insectos los fitoplasmas invaden el estómago, lumen del intestino, glándulas salivales y otros órganos donde se acumulan en gran número tanto dentro como fuera de las células (Ammar and Hogenhout, 2006).

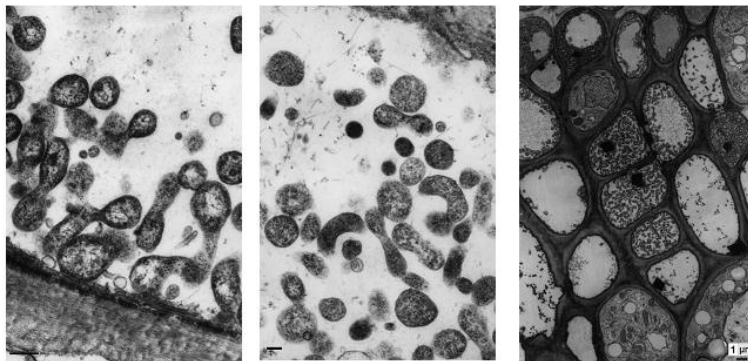


Figura 1.1: Imágenes de microscopía electrónica de transmisión en donde se visualizan células de fitoplasmas de distintas formas en el citoplasma de los elementos cribosos del floema. Barra= 200μm o 1μm (tomado y modificado de Bertaccini y Duduk, 2009).

1.2 Sintomatología ocasionada por fitoplasmas

Las plantas infectadas con fitoplasmas exhiben una serie de síntomas que sugieren profundas modificaciones en el normal balance de hormonas y reguladores del crecimiento. La sintomatología asociada a fitoplasmas incluye virescencia (desarrollo de flores verdes y la pérdida de los pigmentos normales de las flores), filodia (desarrollo de piezas vegetativas en reemplazo de piezas florales), esterilidad de flores, proliferación de brotes auxiliares o axilares generando el síntoma denominado "escoba de bruja", acortamiento de entrenudos, achaparramiento o enanismo generalizado, cambios en la coloración de hojas y tallos, deformaciones en hojas (abarquillamiento, reducción del tamaño) y declinamiento generalizado, en leñosas se produce el conocido síntoma de "die back", generando ramas que se secan hasta terminar con la muerte completa del árbol (Lee et al., 2000; Bertaccini, 2007; Hogenhout et al., 2008) (Figura 1.2). Dentro de los síntomas que se producen en el interior de los tejidos afectados en las plantas infectadas se puede observar deposición de calosa en las placas cribosas, decoloración y colapso de los elementos cribosos y células acompañantes, producción abundante de elementos cribosos de menor tamaño por hiperactividad cambial, también se puede

observar decoloración de laticíferos como ocurre en la enfermedad ‘papaya dieback’ (Braun y Sinclair, 1978; Siddique et al., 1998).

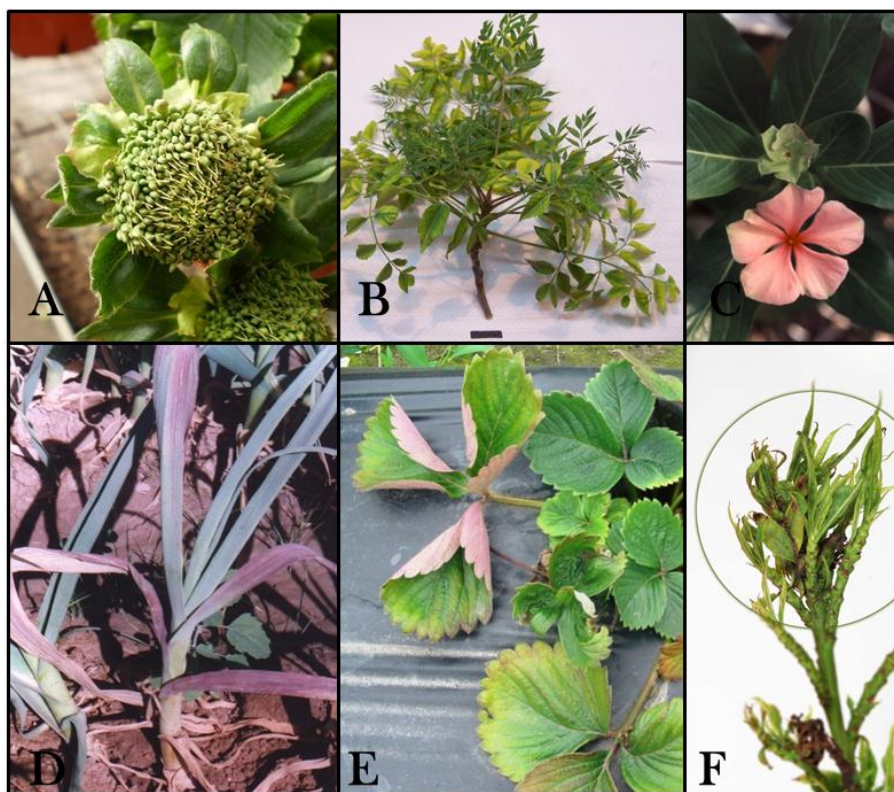


Figura 1.2: Diversas sintomatologías ocasionadas por fitoplasmas. A: filodia en frutilla (*Fragaria x ananassa*) en donde se observa claramente la formación de estructuras vegetativas sobre las piezas florales, B: amarillamiento y acortamiento de entrenudos en paraíso (*Melia azedarach*), C: virescencia en vinca (*Catharanthus roseus*), D: “tristeza del ajo” (*Allium sativum*) donde se observa un cambio en la coloración normal de la hoja (enrojecimiento) y un aspecto de declinamiento generalizado, E: “enrojecimiento letal de la frutilla” caracterizado por el acortamiento y enrojecimiento de la cara abaxial de las hojas maduras y F: “amarillamiento del duraznero” (*Prunus persica*) caracterizado por el acortamiento de entrenudos y la disminución en el tamaño de las hojas. La imágenes son propiedad del grupo de trabajo de fitoplasmas (IPAVE-CIAP).

Dado que el daño producido por esta clase de sintomatología puede ocasionar pérdidas económicas, el conocimiento de los mecanismos asociados a estos resulta fundamental. Se conoce que los fitoplasmas secretan al citoplasma del hospedante (planta/insecto) proteínas llamadas *efectoras*, las cuales cumplen el rol de aumentar la capacidad de colonización y proliferación de estos patógenos en tejidos del huésped (Sugio et al., 2011a). En fitoplasmas han sido bien estudiadas dos de estas proteínas efectoras, SAP11 y TENGU, las cuales son secretadas vía sistema sec al citoplasma de las células de los elementos cribosos para luego dirigirse al núcleo de las mismas. Para el caso de la proteína SAP11, se ha demostrado en *Arabidopsis* que desestabiliza factores de transcripción del tipo II (TCPs II) los cuales están relacionados con la regulación de las ramificaciones del tallo y el desarrollo de hojas. Plantas de

Arabidopsis que expresaron de manera transgénica la proteína SAP11 desarrollaron una sintomatología consistente con la ocasionada por el fitoplasma AY-WB (*Aster Yellows Witches broom*), del cual se aisló la SAP11 (Sugio et al., 2011b). El fitoplasma AY-WB presenta otra proteína efectora denominada SAP54, la cual induce la formación de estructuras vegetativas sobre las piezas florales las cuales se asemejan a los síntomas característicos de filodia ocasionada por dicho fitoplasma promoviendo esta sintomatología una mayor colonización de insectos vectores sobre la planta afectada (MacLean et al., 2014). Para el caso del fitoplasma OY-M (*Onion Yellows*) se ha caracterizado la proteína efectora llamada TENGU, que induce en plantas transgénicas, enanismo y "escoba de bruja", ocasionado el mismo fenotipo que las plantas infectadas por el fitoplasma anteriormente mencionado (Hoshi et al., 2009; Sugawara et al., 2013).

1.3 Mecanismos de transmisión de los fitoplasmas

En la naturaleza su propagación se da mediada por la intervención de insectos vectores que se alimentan de la savia en el floema de plantas afectadas (Christensen et al., 2005; Hogenhout et al., 2008), la acción de plantas epifitas o la propagación vegetativa (Lee et al., 1992). Entre los mecanismos de propagación mediadas por el hombre podemos mencionar los injertos con material infectado, así como la manipulación de las plantas epifitas o de la propagación vegetativa (Bertaccini y Duduk, 2009)

1.3.1 Transmisión mediada por insectos

Los insectos vectores de fitoplasmas son del Orden Hemiptera, principalmente especies de la Familia Cicadellidae, conocidos vulgarmente como “chicharritas” o “leafhoppers”, y también aunque en menor medida las familias Cicadellidae, Fulgoroidea, Delphacidae, Derbidae, Flatidae, Psyllidae, Pentatomidae y Tingidae son transmisoras de fitoplasmas (Weintraub y Beanland , 2006). Los insectos adquieren los fitoplasmas cuando se alimentan de plantas infectadas. Una vez en el tracto digestivo, penetran en las células del intestino donde logran multiplicarse. Estudios realizados con espiroplasmas sugieren que la principal vía de infección de las células de insectos es a través de la endocitosis (Fletcher et al., 1998). Para lograr infección, los microorganismos necesitan proteínas de membrana (adhesinas) que medien la adhesión

a la membrana plasmática de las células del hospedante. Al igual que otros *Mollicutes*, es posible que los fitoplasmas utilicen este mecanismo de infección. Dentro de las vesículas endocíticas, los fitoplasmas se multiplican y posteriormente son liberados en la hemolinfa del hospedante. Una vez libres, logran alcanzar altas concentraciones e invaden diferentes órganos del insecto. Se han detectado fitoplasmas en tubos de Malpighi, cuerpos grasos, ganglio cerebral y órganos reproductivos de los insectos infectados (Weintraub y Beanland, 2006).

Para que un insecto pueda transmitir fitoplasmas, los patógenos deben invadir las glándulas salivales y ser liberados junto con la saliva durante la alimentación. Si bien ésta es la principal vía de diseminación mediada por insectos, se ha demostrado que la transmisión transovárica puede ocurrir. Aunque son escasos los registros, se demostró infección en huevos de hembras infectadas que pueden dar lugar a ninfas y adultos infectivos (Kawakita et al., 2000; Hanboonsong et al., 2002; Tedeschi et al., 2006).

1.3.2 Otros mecanismos de transmisión y de propagación

Un mecanismo comúnmente empleado en la transmisión experimental de fitoplasmas, es el empleo de la planta holoparasita *Cuscuta sp.* la cual forma un puente de conexión vascular entre la planta infectada y la planta receptora (Birschwilks et al., 2006). Esta clase de propagación es una de las maneras más comunes de mantener y propagar fitoplasmas con fines de investigación superando la barrera de las especies. De esta manera se puede transmitir el patógeno desde el hospedante natural hacia el hospedante experimental que se desee usar (Pribylová and Josef Špak, 2013). Dentro de los hospedantes experimentales utilizados para mantener fitoplasmas se encuentra la planta de vinca (*Catharanthus roseus*), la cual desarrolla síntomas característicos ante la presencia de dichos patógenos. Este hospedante experimental se puede reproducir mediante esquejes, obteniéndose material genéticamente homogéneo facilitando la comparación de la sintomatología desarrollada por fitoplasmas distintos (Davis and Lee, 1991)

Otra práctica ampliamente difundida para la propagación de fitoplasmas es la del injerto, la cual permite transmitir y diseminar el patógeno desde una planta enferma hacia una sana mediante la conexión entre los tejidos vasculares, sin intermediación o

necesidad de insectos vectores (Bertaccini, 2007). Estas prácticas también son usadas para la transmisión y propagación de fitoplasmas en condiciones controladas en la experimentación, sobre todo en las especies del tipo leñosas, aunque en algunas herbáceas, tales como vinca, también es empleado (Hodgetts et al., 2013)

En lo que se refiere a la propagación mediada por semillas hay estudios que han demostrado presencia de fitoplasmas en los embriones de semillas de cocotero tanto por PCR como por microscopía (Cordova et al., 2003). Otros estudios han podido demostrar la presencia de fitoplasmas en plantas de tomate provenientes de semillas de plantas infectadas (Calari et al., 2011), pero no son concluyentes y se necesitan más investigaciones para explicar los mecanismos mediante los cuales sería posible este tipo de transmisión.

1.4 Filogenia y taxonomía en fitoplasmas

De acuerdo con la taxonomía actual, la clase *Mollicutes*, a la cual pertenecen los fitoplasmas, está incluida dentro del Phylum *Firmicutes* Dominio Bacteria (Ludwig y Klenk, 2010). Las principales características que diferencian a los *Mollicutes* de las bacterias Gram Positivas son su reducido tamaño (0,2-0,8 μm), ausencia de pared celular, genomas pequeños (entre 580- 2,200kb) y bajo contenido G+C (entre 23-41 %) (Hogenhout et al., 2008). Estudios llevados a cabo sobre la secuencia del gen 16S rDNA en *Mollicutes* y otros procariontes provistos de pared celular indicaron que los primeros provienen de un ancestro Gram positivo del tipo *Clostridium*, del linaje de los lactobacilos (Woese et al., 1980). Los diferentes miembros de la clase *Mollicutes* poseen características propias con diferentes estilos de vida, que comprenden desde aquellos que viven como parásitos en animales vertebrados incluyendo humanos, organismos de vida libre, parásitos obligados anaeróbicos de animales, parásitos de insectos y de otros artrópodos, y los fitoplasmas que son endoparásitos obligados que alternan entre los insectos vectores y las plantas hospedantes (Zhao et al., 2015). Dentro de la clase *Mollicutes* existen 4 cuatro órdenes bien definidos *Mycoplasmatales* (Freundt, 1955; Edward y Freundt, 1967; Tully et al., 1993), *Acholeplasmatales* (Freundt et al., 1984), *Anaeroplasmatales* (Robinson y Freundt, 1987) y *Entomoplasmatales* (Tully et al., 1993) (Tabla 1.1).

Tabla 1.1: Principales características y taxonomía de los clados que conforman a los Mollicutes (Modificado de Razin et al, 1998, Razin 2001 y Zhao et al., 2015). En gris se destaca el clado de los fitoplasmas. Tamaño del genoma: rango conocido menor-mayor; Mol%G/C: proporción de Guanina + Citosina.

| Clasificación | Tamaño del genoma (kb) | Mol% G/C | Requerimientos de colesterol | Habitad | Propiedades características |
|----------------------------------|------------------------|----------|------------------------------|---|-----------------------------------|
| Orden I: Mycoplasmatales | | | | | |
| Familia I: Mycoplasmataceae | | | | | |
| Genero I: <i>Mycoplasma</i> | 580-1,350 | 23-40 | SI | Parasito de humanos y animales | Parásitos de superficie |
| Genero II: <i>Ureplasma</i> | 760-1,170 | 27-30 | SI | Parasito de humanos y animales | Ureasa positivos |
| Orden II: | | | | | |
| Entomoplasmatales | | | | | |
| Familia I: Entomoplasmataceae | | | | | |
| Genero I: <i>Entomoplasma</i> | 790-1,140 | 27-29 | SI | Habitantes del estómago de artrópodos y algunas plantas | no helicoidales, sin movilidad |
| Genero II: <i>Mesoplasma</i> | 870-1,100 | 27-30 | SI | Habitantes del estómago de artrópodos y algunas plantas | |
| FamiliaII:Spiroplasmataceae | | | | | |
| Genero I: <i>Spiroplasma</i> | 780-2,220 | 24-31 | SI | Habitantes del estómago de artrópodos y algunas plantas | Filamentos helicoidales y móviles |
| Orden III:Acholeplasmatales | | | | | |
| Familia I: Acholeplasmataceae | | | | | |
| Genero I: <i>Acholeplasma</i> | 1,500-1,650 | 29-34 | NO | Animales, algunas plantas e insectos | Saprotíficos |
| <i>Candidatus</i> Phytoplasma | 580-1,350 | 23-29 | SI | Endosimbionte obligado de plantas e insectos | No cultivados <i>in vitro</i> |
| Orden IV: | | | | | |
| Anaeroplasmatales | | | | | |
| Familia I: Anaeroplasmataceae | | | | | |
| Genero I: <i>Asteroplasma</i> | 1,500-1,600 | 29-34 | SI | Rumen bovino/ovino | Anaerobios sensibles al oxígeno |
| Genero II: <i>Asteroleplasma</i> | 1,5 | 40 | NO | Rumen bovino/ovino | Anaerobios sensibles al oxígeno |

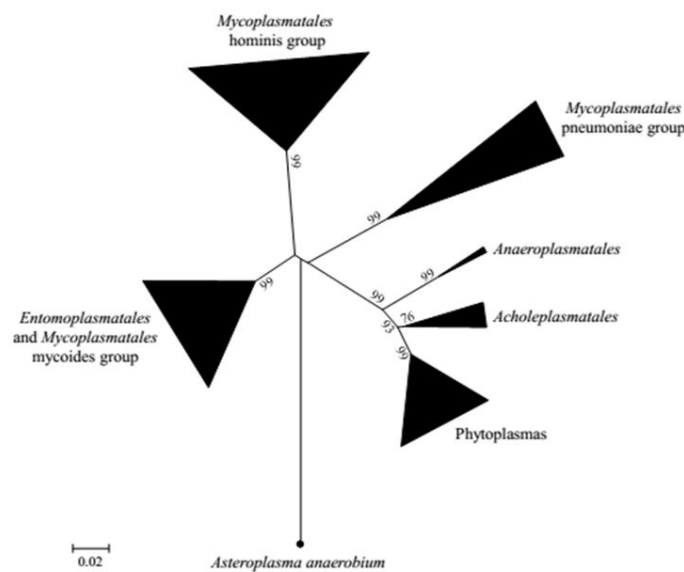


Figura 1.3: Relaciones filogenéticas de los distintos grupos de *Mollicutes* inferidas a partir del análisis del gen 16S rDNA. Las distancias evolutivas del árbol se calcularon empleando el método de Maximum-likelihood. El soporte estadístico del árbol se realizó mediante bootstrap (1000 réplicas). Los taxos empleados en la reconstrucción filogenética incluyen todas las especies validadas de la clase *Mollicutes* y las cepas de referencia de todos los ‘*Ca. Phytoplasma*’ descritos hasta el momento (tomado y modificado de Zhao et al., 2015).

De acuerdo con el análisis de la secuencia del gen 16S rDNA, los fitoplasmas constituyen un clado monofilético dentro de la clase *Mollicutes*, bien diferenciados de los *Mycoplasmas* y *Spiroplamas*, más relacionados con los *Acholeplasmatales* (Lim y Sears, 1989, Zhao et al., 2015) (Figura 1.3). Dadas las diferencias encontradas tanto en el estilo de vida, en los caracteres morfológicos, en los hospedantes y la filogenia basada en la secuencia de distintos genes, en el año 1993 se propuso que los organismos denominados Mycoplasma Like Organism (MLO's) sean llamados Fitoplasmas (International Committee on Systematic Bacteriology Subcommittee on the Taxonomy of *Mollicutes*, 1993).

A diferencia de los organismos con reproducción sexual, en los procariontes resulta difícil establecer el concepto de especie. Sin embargo, existe consenso entre los taxónomos en la utilización de las secuencias genómicas y las relaciones filogenéticas como base para la taxonomía de bacterias. Cuando no se cuenta con las secuencias genómicas completas, la definición de especie bacteriana incluye a aquellas cepas con homología de por lo menos el 70% en su ADN (Wayne et al., 1987). En el caso de los fitoplasmas, la imposibilidad de cultivarlos en forma axénica dificulta la determinación

de homología entre sus genomas. Hasta la fecha, el gen 16S rDNA evolutivamente conservado ha sido el marcador filogenético más potente en la resolución taxonómica de procariotas, y la filogenia derivada del análisis de dicho gen constituye la columna vertebral de la sistemática en procariotas (Ludwig y Klenk, 2010).

Al igual que en otros procariotas, el gen 16S rDNA está altamente conservado dentro del clado de los fitoplasmas y contiene información útil para la diferenciación de las distintas cepas (Rosselló-Mora y Amann, 2001). El establecimiento de un esquema de clasificación basado en la secuencia y los perfiles de RFLP del gen 16S rDNA (Lee et al., 1993; Gundersen et al., 1994), con periódicas actualizaciones (Zhao et al., 2009a, Nejat et al., 2013), han proporcionado marcadores moleculares fiables tanto para la detección como para la identificación de una amplia gama de fitoplasmas en un sistema de grupos y subgrupos, donde cada grupo contiene una especie de fitoplasma distinta y cada subgrupo contiene cepas de fitoplasmas con idéntico o casi idéntico perfil RFLP. La disponibilidad de dicho esquema ha estimulado y ampliado las investigaciones en fitoplasmas durante los últimos 20 años y, como consecuencia, nuevos linajes han sido descubiertos y caracterizados en distintas regiones del mundo (Zhao et al., 2009a). Empleando este sistema de clasificación ya se han delineado al menos 32 grupos 16Sr de fitoplasmas y más de 100 subgrupos (Wei et al., 2007; Zhao et al., 2009a; Nejat et al., 2013).

Según el criterio recomendado por el Comité Internacional de Sistemática de Bacterias (ICSB, 1997), los fitoplasmas deben ser considerados a nivel de género (*Phytoplasma*) y por lo menos cada grupo 16Sr representar una potencial especie. También se debe tener en cuenta que para la clasificación de bacterias no cultivables corresponde aplicar la categoría provisional de *Candidatus* (ICSB, 1995).

La descripción de un nuevo “*Candidatus* (*Ca.*) *Phytoplasma*” deberá estar fundamentada en la secuencia única del gen 16S rDNA que pertenecerá a la cepa de referencia. En general, de acuerdo con las reglas sugeridas por el IRPCM (2004) un nuevo “*Ca. Phytoplasma*” debe referenciarse a una única secuencia del gen 16S rDNA, mayor a 1200pb la cual debe presentar menos del 97,5% de similitud respecto de todos los *Ca. Phytoplasma* descritos previamente. En el caso que la similitud sea mayor al

97,5% serán considerados nuevos “*Ca. Phytoplasma*” aquellos que claramente representen una población ecológica separada (hospedante, vector, ubicación geográfica, etc). El gen 16Sr DNA del nuevo “*Ca. Phytoplasma*” deberá poseer al menos una región única además de la secuencia característica de fitoplasmas: 5’-CAAGAYBATKATGKKTAGGCGYGGDCT-3’ (IRPCM, 2004). Bajo este criterio, se han descrito en todo el planeta, 37 “*Ca. Phytoplasma* especies” que están ocasionando enfermedades con diversos grados de importancia en numerosas especies vegetales (Tabla 1.2).

Tabla 1.2: Listado de ‘Candidatus *Phytoplasma* especies’ descritos hasta el momento

| ‘ <i>Ca. Phytoplasma</i> especie’ | Enfermedad asociada | Grupo/subgrupo 16Sr | Referencia |
|---|--------------------------------------|---------------------|-----------------------------|
| ‘ <i>Ca. Phytoplasma asteris</i> ’ | Amarillamiento del aster | 16SrI-B | Lee et al., 2004a |
| ‘ <i>Ca. Phytoplasma aurantifolia</i> ’ | Escoba de bruja de la lima | 16SrII-B | Zreik et al., 1995 |
| ‘ <i>Ca. Phytoplasma pruni</i> ’ | X-disease en durazneros | 16SrIII-A | Davis et al., 2013 |
| ‘ <i>Ca. Phytoplasma ulmi</i> ’ | Amarillamiento del olmo | 16SrV-B | Lee et al., 2004b |
| ‘ <i>Ca. Phytoplasma ziziphi</i> ’ | Escoba de bruja de ziziphi | 16SrV-B | Jung et al., 2003b |
| ‘ <i>Ca. Phytoplasma rubi</i> ’ | Enanismo en <i>Rubus</i> sp. | 16SrV-D | Malembic-Maher et al., 2011 |
| ‘ <i>Ca. Phytoplasma trifolii</i> ’ | Proliferación del trébol | 16SrVI-A | Hiruki y Wang, 2004 |
| ‘ <i>Ca. Phytoplasma fraxini</i> ’ | Amarillamiento del fresno | 16SrVII-A | Griffiths et al., 1999 |
| ‘ <i>Ca. Phytoplasma phoenicium</i> ’ | Enfermedad letal del almendro | 16SrIX-D | Verdin et al., 2003 |
| ‘ <i>Ca. Phytoplasma mali</i> ’ | Proliferación del manzano | 16SrX-A | Seemüller y Schneider, 2004 |
| ‘ <i>Ca. Phytoplasma pyri</i> ’ | Declinamiento del peral | 16SrX-C | Seemüller y Schneider, 2004 |
| ‘ <i>Ca. Phytoplasma spartii</i> ’ | Escoba de bruja en <i>Spartium</i> | 16SrX-D | Marcone et al., 2004a |
| ‘ <i>Ca. Phytoplasma prunorum</i> ’ | Amarillamiento en frutales de carozo | 16SrX-F | Seemüller y Schneider, 2004 |
| ‘ <i>Ca. Phytoplasma oryzae</i> ’ | Amarillamiento enanizante del arroz | 16SrXI-A | Jung et al., 2003a |
| ‘ <i>Ca. Phytoplasma solani</i> ’ | Síndrome de madera negra en vid | 16SrXII-A | Quaglino et al., 2013 |
| ‘ <i>Ca. Phytoplasma solani</i> ’ | Madera negra de la vid | 16SrXII-A | Qualigno et al., 2013 |
| ‘ <i>Ca. Phytoplasma australiense</i> ’ | Amarillamiento de la vid | 16SrXII-B | Davis et al., 1997 |
| ‘ <i>Ca. Phytoplasma japonicum</i> ’ | Filodia de la hortensia | 16SrXII-D | Sawayanagi et al., 1999 |
| ‘ <i>Ca. Phytoplasma fragariae</i> ’ | Amarillamiento de la frutilla | 16SrXII-E | Valiumas et al., 2006 |
| ‘ <i>Ca. Phytoplasma cynodontis</i> ’ | Hoja blanca de la bermuda grass | 16SrXIV-A | Marcone et al., 2004b |
| ‘ <i>Ca. Phytoplasma castaneae</i> ’ | Escoba de bruja del castaño | 16SrXIX-A | Jun et al., 2002 |
| ‘ <i>Ca. Phytoplasma brasiliense</i> ’ | Escoba de bruja del <i>Hibiscus</i> | 16SrXV-A | Montano et al., 2001 |
| ‘ <i>Ca. Phytoplasma graminis</i> ’ | Amarillamiento de gramíneas | 16SrXVI-A | Arocha et al., 2005 |
| ‘ <i>Ca. Phytoplasma caricae</i> ’ | Fitoplasmosis en papaya | 16SrXVII-A | Arocha et al., 2005 |
| ‘ <i>Ca. Phytoplasma americanum</i> ’ | Punta morada de la papa | 16SrXVIII-A | Lee et al., 2006 |
| ‘ <i>Ca. Phytoplasma rhamni</i> ’ | Escoba de bruja del espino | 16SrXX-A | Marcone et al., 2004a |
| ‘ <i>Ca. Phytoplasma pini</i> ’ | Fitoplasmosis en <i>Pinus</i> sp. | 16SrXXI-A | Schneider et al., 2005 |
| ‘ <i>Ca. Phytoplasma palmicola</i> ’ | Amarillamiento letal del cocotero | 16SrXXII-A | Harrison et al., 2014 |
| ‘ <i>Ca. Phytoplasma omanense</i> ’ | Escoba de bruja del sen de Oman | 16SrXXIX-A | Al-Saady et al., 2008 |
| ‘ <i>Ca. Phytoplasma tamaricis</i> ’ | Escoba de bruja del tamarindo | 16SrXXX-A | Zhao et al., 2009b |
| ‘ <i>Ca. Phytoplasma costaricanum</i> ’ | Enanismo de la soja | 16SrXXXI-A | Lee et al., 2011 |
| ‘ <i>Ca. Phytoplasma malaysianum</i> ’ | Virescencia y filodia en Vinca | 16SrXXXII | Nejat et al., 2013 |
| ‘ <i>Ca. Phytoplasma sudamericanum</i> ’ | Proliferación en maracuyá | 16SVI-I | Davis et al., 2012 |
| ‘ <i>Ca. Phytoplasma allocasuarinae</i> ’ | Amarillamiento de la allocasuarina | ND | Marcone et al., 2004a |
| ‘ <i>Ca. Phytoplasma lycopersici</i> ’ | Hoja de perejil en tomate | ND | Arocha et al., 2007 |
| ‘ <i>Ca. Phytoplasma convolvuli</i> ’ | Amarillamiento de la correhuela | ND | Martini et al., 2012 |
| ‘ <i>Ca. Phytoplasma balanitae</i> ’ | Escoba de bruja de la balanita | ND | Win et al., 2012 |

Si bien, el análisis de los patrones PCR-RFLP del gen 16S rDNA ha sido una herramienta ampliamente utilizada en la identificación de grupos/subgrupos de fitoplasmas, el secuenciamiento y los análisis *in silico* de las mismas (Wei et al., 2007) ha demostrado que existen diferencias en las secuencias de aislamientos pertenecientes al mismo subgrupo que no pueden ser identificadas mediante el esquema tradicional de PCR-RFLP del gen 16Sr. Para suplir estas falencias se han explorado otras regiones genómicas más variables. Entre los genes analizados se encuentran: el gen *tuf* que codifica para el factor de elongación Tu (Contaldo et al., 2015), genes *rp* de proteínas ribosomales (Martini et al., 2007, Lee et al., 2010) y la región espaciadora 16S-23S del operón de ARN ribosomal (Hodgetts et al., 2008). Para conseguir una mejor identificación de cepas estrechamente relacionadas, más recientemente se analizaron genes relacionados con el mantenimiento, metabolismo y sistemas de translocación de proteínas, como los genes *secY*, *secA*, *map* y *uvrB-degV* (Arnaud et al., 2007; Hodgetts et al., 2008).

1.5 El genoma de los fitoplasmas

El análisis comparativo de los genomas secuenciados hasta el momento, demostró diversidad en el tamaño de los genomas, en su composición, rutas metabólicas y número de repeticiones. Gracias a los avances logrados en el campo de la tecnología y metodología de secuenciación, se ha podido secuenciar el genoma completo (o incompleto, *drafts*) de numerosos fitoplasmas lo que ha resultado en una profundización del conocimiento en la genómica en esta clase de patógenos. Hasta el momento, se ha logrado secuenciar de manera completa el genoma de 5 fitoplasmas, i) “*Ca. Phytoplasma asteris*” aislamiento OY-M (Oshima et al., 2004); ii) “*Ca. Phytoplasma asteris*” aislamiento AY-WB (Bai et al., 2006), iii) “*Ca. Phytoplasma australiense*” aislamiento Rp-A (Tran-Nguyen et al., 2008), iv) “*Ca. Phytoplasma australiense*” aislamiento NZB11s (Andersen et al., 2013) y v) “*Ca. Phytoplasma mali*” aislamiento AT (Kube et al., 2008) (Tabla 1.3). Se han secuenciado de manera incompleta los genomas de los fitoplasmas Peanut WB (Chung et al., 2013), “*Ca. Phytoplasma solani*” (Mitrovic et al., 2014), “*Ca. Phytoplasma asteris*” aislamiento OY-V (Kakizawa et al., 2014), Wheat blue dwarf phytoplasma (Chen et al., 2014) y 4 aislamientos de fitoplasmas pertenecientes al grupo 16SrIII (Saccardo et al., 2012).

Tabla 1.3: Principales características de los genomas de fitoplasmas secuenciados de manera completa hasta el momento y de *A. laidlawii* cercanamente emparentada (tomado de Kube et al., 2012).

| Aislamiento | <i>Ca. asteris</i> OY-M | <i>Ca. asteris</i> AY-WB | <i>Ca. australiense</i> Rp- A | <i>Ca. mali</i> AT | <i>Acholeplasma</i> <i>laidlawii</i> PG-8A |
|--|----------------------------|-----------------------------|----------------------------------|-----------------------|---|
| Organización del cromosoma | del circular | circular | Circular | lineal | circular |
| Tamaño del cromosoma | 853,092 | 706,569 | 879,959 | 601,943 | 1,496,992 |
| Contenido G+C (%) | 27.76 | 26.89 | 27.42 | 21.39 | 31.93 |
| Contenido G+C (%)-ORF ^a | 29.09 | 28.54 | 28.72 | 22.58 | 32.23 |
| Genes codificantes | 752 | 776 | 684 | 481 | 1,380 |
| Regiones codificantes (%) | 73.1 | 73.7 | 64.1 | 76.3 | 90.7 |
| Tamaño promedio de regiones codificantes | 829 | 776 | 825 | 955 | 984 |
| Proteínas-regiones codificantes/kb | 0.881 | 0.949 | 0.777 | 0.799 | 0.921 |
| Operones rRNA | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| tRNAs | 32 | 31 | 35 | 32 | 34 |
| plásmidos | 2 | 4 | 1 | 0 | - |
| Acceso GenBank | AP006628 | CP000061 | AM422018 | CU469464 | CP000896.1 |

El genoma de los fitoplasmas ha sido sometido a una rápida evolución, como consecuencia de un ciclo de vida que alterna entre las plantas hospedantes y los insectos vectores. Esto requiere adaptaciones a un rango amplio de ambientes, que incluyen el floema de las plantas hospedantes, el lumen del estómago, hemolinfa, saliva y órganos del insecto vector (Hogenhout et al., 2008). El análisis de los genomas secuenciados ha demostrado una reducción en el número de genes implicados en rutas metabólicas básicas. Los fitoplasmas carecen de vías metabólicas funcionales para el metabolismo de azúcares, genes implicados en la síntesis *de novo* de aminoácidos, ácidos grasos y nucleótidos (Oshima et al., 2013). Lo que más sorprende, sin embargo, es la ausencia de genes del sistema de transportadores PTS (para la importación de azúcares esenciales en la glucólisis), ausencia del gen de la proteína FtsZ (tipo tubulina, esencial para la división celular) y genes de ATP sintasas tipo F, involucradas en la generación del potencial de membrana para la síntesis de ATP (Christensen et al., 2005). La ausencia de la mayoría de los genes relacionados con la síntesis de nucleótidos indicaría que, probablemente, los fitoplasmas no los sintetizan y los absorben desde su ambiente (Oshima et al., 2013). Como contraparte a la ausencia de numerosos genes asociados a

metabolismo y síntesis, los fitoplasmas poseen numerosos genes que codifican para sistemas de transporte. Ante la carencia de genes considerados como esenciales para los organismos, se sugirió una evolución reductiva como consecuencia de la vida de parásito intracelular en un ambiente rico en nutrientes (Oshima et al., 2002; 2004).

A pesar de su tamaño reducido, el genoma de los fitoplasmas contiene un número substancial de genes en múltiples copias (Oshima et al., 2004; Bai et al., 2006; Jomantiene y Davis, 2006; Jomantiene et al., 2007, Arashida et al., 2008; Tran-Nguyen et al., 2008). La mayoría de estos genes dispuestos en múltiples copias, están organizados en *clusters* denominados *potencial mobile units* (PMUs) (Bai et al., 2006) o *sequence-variable mosaics* (SVMs; Jomantiene and Davis, 2006; Jomantiene et al., 2007; Wei et al., 2008). En el genoma del fitoplasma AY-WB se ha identificado la presencia de un PMUs (PMU1) el cual presenta un tamaño de 20kb y está compuesto por 21 marcos abiertos de lectura (Bai et al., 2006) relacionados con la replicación del ADN (*ssb*, *dnaB* y *dnaG*), la recombinación (*himA*), factores de transcripción (*sigF*), genes codificantes de proteína de membrana y proteínas de secreción. Si bien se conoce poco acerca de cómo funcionan estos PMUs, se cree que cumplirían un rol fundamental en los mecanismos de adaptación a las plantas hospedantes y a los insectos vectores (Bai et al., 2006, Oshima et al., 2013).

Por otro lado, la presencia de ADN extracromosomal (plásmidos) ha sido detectada en los fitoplasmas “*Ca. Phytoplasma asteris*” AY-WB/OY-M pero no en “*Ca. Phytoplasma mali*”. Todos los plásmidos contienen genes relacionados con la amplificación por círculo rodante y genes que codifican proteínas con destino a membrana (Bai et al., 2006). En el fitoplasma OY-M, se ha demostrado que el plásmido aislado a partir de una línea no transmisible de dicho fitoplasma carece de dos ORFs que si están presentes en las líneas transmisibles (*wild-type*), sugiriendo que los plásmidos portan proteínas vinculadas con la transmisibilidad y la especificidad al hospedante (Nishigawa et al., 2002a).

En el fitoplasma “*Ca. Phytoplasma asteris*” OY, se han identificado genes que codifican para las proteínas *secA*, *secY* y *secE*, las cuales son componentes esenciales del sistema de secreción del tipo *sec* en bacterias (Economu, 1999). Estas proteínas

fueron identificadas (Kakizawa et al., 2001, 2004) y se ha demostrado la expresión de la proteína secA en plantas infectadas (Kakizawa et al., 2001, Wei et al., 2004). Estos genes también han sido identificados en el genoma de otros fitoplasmas (Bai et al., 2006, Kube et al., 2008, Tran-Nguyen et al., 2008, Andersen et al., 2013) y el gen que codifica la proteína SecY ha sido clonado de diversas razas de fitoplasmas (Lee et al., 2006, 2010).

1.6 Mecanismos de interacción fitoplasma-hospedante: proteínas inmunodominantes de membrana

Se ha corroborado que un grupo específico de proteínas de membrana, a las que se las conoce como proteínas inmunodominantes de membrana (immunodominant membrane proteins: IDPs), constituyen la mayor porción del total de proteínas de la membrana celular en la mayoría de los fitoplasmas (Shen y Lin, 1993).

Estudios de inmunomarcación con oro en microscopía electrónica han demostrado que las IDPs están localizadas en el exterior de la superficie celular (Milne et al., 1995). Dado que los fitoplasmas no tienen pared celular, sus proteínas de membrana se encuentran en contacto directo con el citoplasma de las células hospedantes, y es por ello que son excelentes candidatas para cumplir roles en la interacción con sus hospedantes. Los genes que codifican dichas proteínas han podido ser aislados y secuenciados en numerosos fitoplasmas (Berg et al., 1999, Blomquist et al., 2001, Barbara et al., 2002, Morton et al., 2003, Kakizawa et al., 2004, 2006b, Galetto et al., 2008, Fabre et al., 2011, Neriya et al., 2011).

Estas IDPs están clasificadas en tres tipos: i) immunodominant membrane protein (Imp), ii) immunodominant membrane protein A (IdpA) y iii) antigenic membrane protein (Amp). Estas IDPs no son ortólogas entre ellas, no muestran similitud aminoacídica y están localizadas en distintas partes del genoma (Barbara et al., 2002; Kakizawa et al., 2006b; Arashida et al., 2008). Todas las IDPs poseen una región central hidrofílica (expuesta al citoplasma de la célula hospedante), aunque la organización de las regiones hidrofílica y transmembrana son variables (Kakizawa et al., 2006b). La IDP tipo Imp está anclada a membrana solamente por una región transmembrana N-terminal, el tipo IdpA presenta dos regiones transmembrana en los extremos N-terminal y C-

terminal, por su parte la IDP tipo amp, presenta también dos regiones transmembrana pero el extremo N-terminal está clivado por lo que esta proteína está anclada a la membrana solo por su extremo C-terminal (Barbara et al., 2002, Kakizawa et al., 2006b) (Figura 1.4).

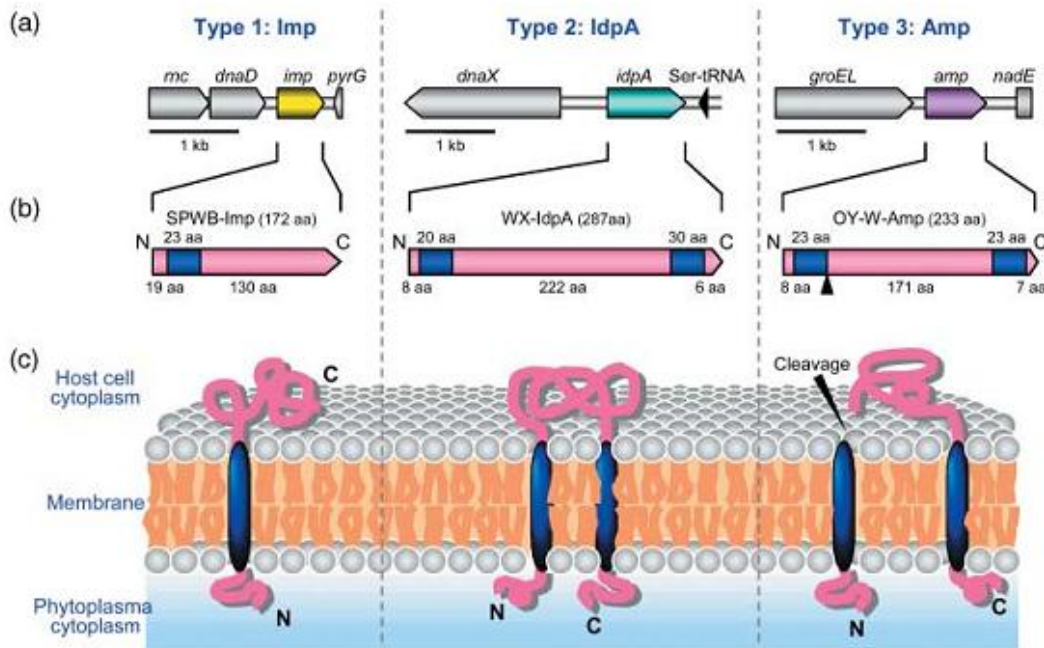


Figura 1.4: Grupos de proteínas inmunodominantes de membrana (IDPs) presentes en fitoplasmas. (a): organización de los genes que rodean a los 3 tipos de IDPs; (b): representación esquemática del producto de translocación putativo para cada proteína IDP, en azul las regiones transmembrana, en rosa las regiones hidrofílicas expuestas, la región transmembrana N-terminal en la proteína Amp presenta un sitio de clivaje (triángulo negro) (c): estructura hipotética de las regiones transmembrana de los tres tipos de IDP, N: región N-terminal, C: región C-terminal tomado de Hogenhout et al., 2008)

Se ha demostrado que el gen codificante para la proteína Imp está presente en el genoma de los fitoplasmas Western X (grupo 16SrIII) (Liefting y Kirkpatrick, 2003) y OY (grupo 16SrI) (Kakizawa et al., 2009) además de la IDPs IdpA y Amp, respectivamente. La similitud de las secuencias para Imp es baja entre diferentes fitoplasmas, sin embargo los genes que la rodean muestran una arquitectura conservada (Kakizawa et al., 2009). En contraste, la proteína IdpA (IDP del fitoplasma Western X), no ha sido identificada en el genoma de otros fitoplasmas (Oshima et al., 2004; Bai et al., 2006; Kube et al., 2012; Tran-Nuguyen et al., 2008; Chen et al., 2014; Kakizawa et al., 2014; Mitrovic et al., 2014). Tampoco ha podido ser registrada la presencia de la proteína amp en el genoma completamente secuenciado del fitoplasma “Ca.

Phytoplasma mali” (Kube et al., 2008). Estas observaciones implicarían que la IDP del tipo *imp* se trata de la proteína ancestral, mientras que las proteínas IDPs tipo *IdpA* o *amp*, fueron aumentando sus niveles de expresión en distintos grupos filogenéticos de fitoplasmas (Kakizawa et al., 2009).

Los genes que se encuentran flanqueando las IDPs, tanto codificantes como no codificantes, son más conservados (presentan menor variabilidad en su secuencia) que las propias IDPs, lo que sugiere que estas proteínas, las IDPs, estarían sometidas a una alta presión de selección (Kakizawa et al., 2004, 2006b, 2009). Se ha demostrado también que los dominios extracelulares hidrofílicos de las IDPs son más divergentes que los dominios transmembrana o el péptido señal, lo que implica que las interacciones fitoplasma-hospedante estarían promoviendo la variabilidad en dichas proteínas (Barbara et al., 2002, Kakizawa et al., 2004). Estudios recientes han demostrado que la IDP tipo *amp* está sometida a una presión de selección positiva, lo que quiere decir que las substituciones a las que se ve sujeta representan una ventaja sobre la aptitud biológica (fitness) del organismo y que juega un rol importante en lo que ha interacción fitoplasma-hospedante se refiere (Kakizawa et al., 2006a, b).

En cuanto a la función específica de estas proteínas, se ha demostrado que la proteína *amp* interacciona con el complejo de microfilamentos en determinados insectos. Se ha podido localizar al fitoplasma OY en los microfilamentos de las células musculares que rodean al tracto digestivo medio y a su vez que la proteína *amp* forma un complejo con las proteínas de insectos como actina, miosina de cadena pesada y miosina de cadena ligera, tanto *in vivo* como *in vitro* (Suzuki et al., 2006). Este complejo *amp*-microfilamentos, está correlacionado con la capacidad de transmitir el fitoplasma OY, es decir los insectos capaces de transmitir al fitoplasma OY son aquellos en los que se demostró una interacción del tipo física *amp*-microfilamentos (Suzuki et al., 2006). También se ha demostrado que la proteína *amp* interacciona con las subunidades α y β de la ATP sintetasa, y que esta interacción se correlaciona con la transmisibilidad del fitoplasma por su insecto vector (Galletto et al., 2011). Por su parte, se ha demostrado que la proteína *imp* del fitoplasma “*Ca. Phytoplasma mali*” interacciona físicamente con las actinas de plantas tanto *in vivo* como *in vitro*, y se hipotetiza que esta unión estaría

relacionada con mecanismos de movilidad dentro de la célula por parte del fitoplasma (Boonrod et al., 2012).

Estudios previos han demostrado que las interacciones bacterias-hospedantes promueven la variabilidad de las proteínas de membrana de bacterias (Deitsch et al., 1997). En el caso de la proteína de membrana OspC del patógeno *Borrelia burgdoferi*, bacteria que ocasiona la enfermedad de Lyme en humanos, es una proteína de adhesión que cumple un rol importante en la infección la cual ha co-evolucionado con el hospedante y quizás ha necesitado cambiar positivamente para poder adaptarse a nuevos hospedantes (Wilske et al., 1996). Basados en este y otros ejemplos no mencionados aquí, este mecanismo podría ser extrapolado a los fitoplasmas, y sugerir que la presión selectiva ha surgido como un mecanismo para su adaptación, con el objetivo de evitar el sistema inmune del insecto o como un mecanismo utilizado para el anclaje a proteínas del hospedante, lo cual es un aspecto importante en la infección ocasionada por numerosos patógenos (Andrews y Gobojobori, 2004)

1.7 Detección de fitoplasmas

La correcta detección e identificación de los diferentes fitoplasmas en cultivos de importancia económica es de gran importancia, ya que determinan las pautas de manejo aplicables a cada patosistema para intentar disminuir el impacto. Antes del desarrollo de las técnicas serológicas y de biología molecular para la detección de fitoplasmas, esta se basaba principalmente en la identificación de los síntomas y la confirmación de la presencia de cuerpos pleomórficos en el floema mediante microscopía electrónica. Además de la dificultad de analizar numerosas muestras y la necesidad de contar con un equipamiento costoso, llevaba a determinaciones erróneas y poco consistentes debido a que los síntomas pueden ser idénticos y tratarse de fitoplasmas diversos (Lee et al., 2000). Las técnicas de detección basadas en la reacción de la cadena de la polimerasa (PCR) que comenzaron a desarrollarse durante la década del 80, resultan hoy la herramienta más empleada tanto en la detección como para la identificación de estos patógenos (Lee et al., 1992; Lee et al., 2000; Nejat y Vadamalai, 2013). Tanto para el diagnóstico como para el análisis de la filogenia, el gen 16S rDNA y la región espaciadora 16S-23S rDNA han sido las más empleadas ya que son regiones aptas para

la generación de *primers* universales que permiten la hibridación en la mayor cantidad de fitoplasmas posibles.

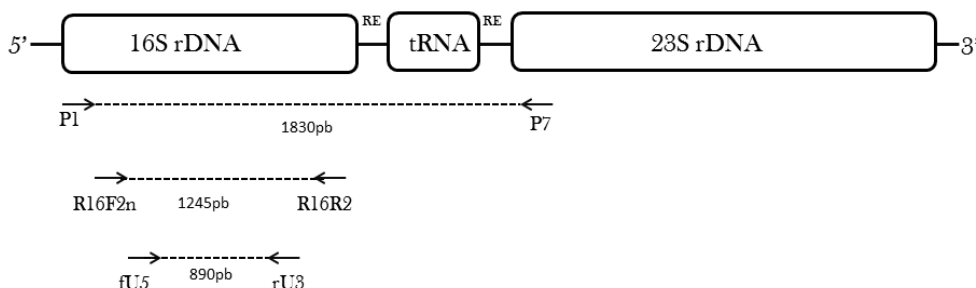


Figura 1.5: Representación gráfica del operon 16S-23S rDNA, mostrando la posición de algunos de los juegos de *primers* universales más comúnmente usados en la detección e identificación de fitoplasma. Cada flecha constituye un primer (y el lugar aproximado de hibridación con el ADN molde), y la línea punteada representa el producto amplificado. Los gráficos no están a escala. RE: región espaciadora.

El operon rRNA en bacterias está conformado por el gen 16S rDNA seguido por una región espaciadora (RE) y el gen 23S rDNA, habiendo 2 copias del mismo en el genoma de fitoplasmas (Hodgetts et al., 2008) (Figura 1.5). Este genes universalmente utilizado para establecer las relaciones filogenéticas en todo el Dominio Bacterias. El empleo tanto de *primers* universales (aptos para la amplificación en todas las especies/grupos de fitoplasmas) como específicos (propios de una especie o de grupo/s) han permitido una rápida y eficiente detección, identificación y clasificación de fitoplasmas en numerosas especies vegetales. Sin embargo, la concentración del patógeno en los distintos tejidos es notablemente desigual, tal como se ha demostrado en el caso de algunas especies leñosas o con presencia de látex (Constable et al., 2003), lo cual sumado a que muchos vegetales contienen compuestos que inhiben la actividad de la enzima polimerasa, conduce a la obtención de falsos negativos. Dadas estas condiciones, se requieren de métodos que permitan la detección de trazas mínimas de ADN fitoplásmico y la obtención de ADN libre de inhibidores. En la actualidad, se han desarrollado técnicas de PCR en tiempo real (qPCR), PCR anidado o PCR múltiple, las cuales han mejorado notablemente la detección e identificación de esta clase de patógenos aún en concentraciones mínimas o en presencia de inhibidores (Baric y Dalla-Via, 2004; Christensen et al., 2004; Hodgetts et al., 2008).

1.8 Importancia fitosanitaria de los fitoplasmas

Los fitoplasmas han sido asociados con enfermedades en más de 1000 especies vegetales que abarcan desde cultivos de importancia alimenticia (industriales, hortalizas, frutas), plantas ornamentales, hasta árboles maderables y de sombra entre otros (Bertaccini, 2007). La lista de enfermedades causadas por fitoplasmas continua creciendo, ya sea por enfermedades emergentes, o por enfermedades cuya etiología permanecía desconocida han sido identificadas como causadas por fitoplasmas en años recientes (Bertacini y Duduk, 2009). Entre las enfermedades causadas por fitoplasmas más conocidas a nivel mundial están el *amarillamiento letal del cocotero* “Lethal Yellowing”, el cual está asociado a más de 35 especies de palmas en América (McCoy et al., 1983; Harrison et al., 1994), la cual ha destruido millones de ejemplares poniendo en peligro la economía de regiones productoras del Caribe y la supervivencia de algunas especies de palmera (Strauss, 2009). En Europa la *flavescencia dorada* en vid, ocasionada por el fitoplasma FD es la enfermedad más importante en la vid en el continente europeo ocasionando cuantiosas pérdidas. Esta plaga cuarentenaria tiene un altísimo impacto en la producción vitivinícola de Italia, España, Francia, Suiza, Portugal, Austria, Serbia, Croacia, Eslovenia, y Hungría (FSA Panel on Plant Health, 2014). Otro ejemplo son los fitoplasmas asociados al grupos aster yellows los cuales ocasionan cuantiosas pérdidas en la producción hortícola (lechuga, zanahoria, apio entre otros) tanto en América del norte como en Europa (Lee et al, 2000). En el Líbano, las plantaciones de almendro (*Prunus amygdalus*), se ven severamente afectadas por el “*Ca. Phytoplasma phoenicium*” el cual se caracteriza por una severa escoba de bruja, pérdida de hojas y frutos seguido por muerte. En solo unos pocos años se han perdido más de 200000 árboles en plena producción (Verdin et al., 2003). El complejo de fitoplasmas del grupo Apple proliferation (16SrX group) comprendido por los fitoplasmas Apple proliferation, European Stone Fruit y Pear Decline ocasionan severas pérdidas en frutales europeos (Seemüller y Schneider, 2004). Todas estas enfermedades y muchas otras que no se mencionan aquí, constituyen verdaderas limitantes de la producción afectando notablemente los rendimientos, y es por ello que en algunos casos se han declarado como plagas cuarentenarias limitando, entre otras cosas, la libre comercialización de productos biológicos entre países.

1.9 Enfermedades causadas por fitoplasmas en Argentina

Hasta el momento en Argentina se han detectado fitoplasmas asociados a 4 grupos 16Sr: i) grupo 16SrI (aster yellows), ii) grupo 16SrIII (X-disease), iii) grupo 16SrVII (ash yellows) y iv) grupo 16SrXIII (Mexican Periwinkle Virescence). Se han contabilizado más de 20 especies vegetales afectadas, entre las que se cuentan algunas de importancia económica tales como el ajo (*Allium sativum*), paraíso (*Melia azedarach*), frutilla (*Fragaria x ananassa*), duraznero (*Prunus persicae*), girasol (*Helianthus annuus*), tomate (*Solanum lycopersicum*) y alfalfa (*Medicago sativa*), así como también numerosas especies nativas, malezas y ornamentales (Conci et al., 2014).

La mayor cantidad y la más amplia distribución se dio en aislamientos pertenecientes al grupo 16Sr III (X-disease), el cual fue registrado afectando especies herbáceas leñosas, nativas así como también ornamentales, en las que la sintomatología estuvo principalmente dominada por una reducción del tamaño de las hojas, escoba de bruja y acortamiento de entrenudos. De acuerdo al sistema de clasificación de fitoplasmas basado en el análisis de los patrones PCR-RFLP (gen 16S rDNA), en Argentina los aislamientos del grupo 16SrIII pertenecen en su mayoría a los subgrupos –B y –J (Galdeano et al., 2004, Fernández et al., 2013a, Guzmán et al., 2014) y a dos nuevos subgrupos exclusivos de nuestro país, recientemente identificados –W y –X (Galdeano et al., 2013). En lo que se refiere al grupo 16SrI (aster yellows), se han identificado los subgrupos –B y –S afectando vinca (*Catharanthus roseus*), maíz (*Zea mays*), zanahoria (*Daucus carota*) y manzanilla (*Matricaria chamomilla*) (Torres et al., 2004, 2011). Para el caso del grupo 16SrVII (Ash yellows) los fitoplasmas han sido detectados en especies herbáceas tales como la alfalfa (Conci et al., 2005), *Artemisia annua* y *Coniza bonariensis* (Meneguzzi et al., 2008) o frutilla (Fernández et al., 2013b) en las que se distinguen dos subgrupos –B y –C, los cuales son exclusivos del cono sur americano. Por último, el grupo 16SrXIII ha sido registrado en paraíso (Arneodo et al., 2005, 2007) y frutilla (Fernández et al., 2008a,b) identificándose el subgrupo –C en paraíso y uno aún por definir en frutilla.

En lo que a epidemiología se refiere, se han estudiado con mayor profundidad los patosistemas alfalfa-fitoplasma *Argentinean alfalfa witches' broom* (ArAWB) (Conci et

al., 2005) y el patosistema ajo-fitoplasma *Garlic Decline* (Galdeano et al., 2004, 2009). El fitoplasma de alfalfa denominado ArAWB pertenece al grupo 16SrVII-C, el cual solo ha sido registrado en alfalfa en Argentina y en frutilla ocasionando filodia (Fernández et al., 2013b). Se han identificado más de 30 especies de leafhoppers asociados al cultivo y en 3 de ellos se ha detectado la presencia del ArAWB, constituyendo así potenciales vectores de la enfermedad (Meneguzzi, 2009).

En todas las regiones de Argentina donde se produce ajo, la enfermedad conocida como *tristeza de ajo* ha sido asociada a la presencia de un fitoplasma denominado Garlic decline phytoplasma (GDIII), perteneciente al subgrupo 16SrIII-J (Conci et al., 1998, Galdeano et al., 2004). Estudios de la entomofauna en el cultivo revelaron la presencia de numerosas especies de Cicadellidos, y se pudo detectar al fitoplasma GDIII en al menos 1 especie a la que se considera potencialmente vector (Catalano et al., 2008). Los estudios epidemiológicos han revelado que la enfermedad ocurre en todas las áreas productoras del país con una alta prevalencia y baja incidencia (Galdeano et al., 2009).

El mejoramiento de las técnicas de detección, permite establecer constantemente la presencia de nuevos fitoplasmas y estudiar otros patosistemas en nuestro país. Recientemente se ha detectado la presencia de un fitoplasma del subgrupo 16SrIII-B asociado al cultivo de duraznero en las regiones productoras del noroeste de nuestro país, ocasionado árboles con un marcado acortamiento de entrenudos, enrojecimiento y acartuchamiento de hojas, necrosis, lo que provoca disminución en el rendimiento (Fernández et al., 2013a). Se han iniciado las tareas para continuar con el estudio de dicho patosistema focalizándose en la identificación de los insectos vectores. Como puede observarse, la correcta identificación de los patógenos y el conocimiento de su diversidad no solo constituyen el primer paso, sino que es una herramienta vital que permite tomar decisiones de manejo acertadas. Además de una identificación precisa del patógeno y del sistema, es necesario establecer los grados de parentesco que presentan respecto a otros fitoplasmas presentes en la región y en el mundo, mediante estudios de caracterización molecular y filogenia, para que de ese modo se pueda inferir el origen de la enfermedad y los posibles manejos de la misma.

1.10 Fitoplasmas del grupo 16SrXIII (*Mexican Periwinkle Virescence*), características e importancia en la región

El grupo 16SrXIII o *Mexican periwinkle virescence group* (MPV) comprende fitoplasmas que afectan a distintas especies vegetales, descritos únicamente para el continente Americano, y que se diferencian claramente del resto de los grupos de fitoplasmas. El fitoplasma *Mexican periwinkle virescence* (MPV), que da nombre al grupo y es la cepa de referencia del subgrupo 16SrXIII-A, fue descrito por primera vez afectando plantas de vinca en México (Gundersen et al., 1994) y con posterioridad en plantas de tomate en la península de baja California (Holguin-Peña et al., 2007). En el GenBank (NCBI) se encuentran depositadas las secuencias relacionadas con el fitoplasma *Mexican potatoe purple top*, también del subgrupo 16SrXIII-A, en distintos hospedantes experimentales como tomate (*Solanum lycopersicum*) (JN087519), pimiento (*Capsicum annuum*) (JQ745314) y papa (*Solanum tuberosum*) (JN087521), los cuales han sido infectados empleando como vector al insecto *Bactericera cockerelli* (Sulc) (Hemiptera: Psyllidae). El fitoplasma STRAWB1 ha sido citado afectando frutillas en la región de Florida (USA) con sintomatología de enanismo y disminución del tamaño floral (Jomantiene et al., 1998). Dadas las diferencias encontradas en el patrón RFLP con respecto al MPV, el fitoplasma STRAWB1 fue asignado como un nuevo subgrupo, 16SrXIII-B. El subgrupo 16SrXIII-C fue descrito por primera vez en paraísos afectados con amarillamiento en distintas localidades de Bolivia (Harrison et al., 2003) siendo el fitoplasma *Chinaberry yellows* (CbY1) la cepa de referencia para el subgrupo. Fitoplasmas del mismo subgrupo fueron detectados y caracterizados posteriormente afectando paraísos tanto en Paraguay como en Argentina (Arneodo et al., 2005, 2007). En Argentina, dicho fitoplasma es conocido como *China tree yellows* (ChTYXIII) y tiene una distribución que se restringe principalmente a la región Noreste (NEA) con algunos casos aislados en Tucumán (Arneodo et al., 2007). En México se detectó la presencia de un fitoplasma asociado a la enfermedad de punta morada de la papa relacionada al grupo MPV. Las diferencias encontradas en los perfiles PCR-RFLP del gen 16S rDNA determinaron que dicho patógeno constituye el nuevo subgrupo, 16SrXIII-D (Santos-Cervates et al., 2010). Por su parte el subgrupo 16SrXIII-E está representado por el fitoplasma *Papaya Apical Curl Necrosis* (PACN), el cual ha sido descrito afectando papaya (*Carica papaya*) en las regiones productoras de Brasil (Melo

et al., 2013). En dicho país, también se ha descrito la presencia de fitoplasmas asociados al grupo 16SrXIII en brócoli (*Brassica oleracea*) ocasionado enanismo, aunque la clasificación definitiva no ha sido aún propuesta (Eckstein et al., 2014).

En Argentina, además del fitoplasma asociado a paraíso, se han descrito fitoplasmas del grupo 16SrXIII afectando el cultivo de frutilla (*Fragaria x ananassa*). Estudios previos han demostrado que la enfermedad conocida como *enrojecimiento letal de la frutilla*, estaría asociada a un fitoplasma del grupo MPV, denominado *Strawberry Red Leaf* (StrawRL), según lo indican sus patrones PCR-RFLP del gen 16S rDNA (Fernández et al., 2008a,b). Las diferencias halladas en estos patrones respecto a los demás subgrupos hacen presumir que se trata de un nuevo subgrupo aún no descrito. Tanto el fitoplasma detectado en paraíso, como el detectado en frutilla no han sido reportados en ninguna otra región de modo que se puede suponer que son propios de Sudamérica.

Precisamente en Sudamérica la presencia de fitoplasmas con características únicas ha sido ampliamente demostrada, ya que se han reportado grupos/subgrupos y especies de fitoplasmas que no han sido descritos en ninguna otra parte del mundo (Montano et al., 2000, Harrison et al., 2003, Galdeano et al., 2004, Conci et al., 2005, Meneguzzi et al., 2008, Davis et al., 2012, Fernández et al., 2013b, Galdeano et al., 2013, Guzmán et al., 2014). Se hipotetiza que los fitoplasmas en Sudamérica han evolucionado divergentemente respecto al resto de los fitoplasmas como consecuencia de un aislamiento geográfico (Montano et al., 2001). El estudio de los fitoplasmas de la región contribuye a un adecuado entendimiento del funcionamiento de los patosistemas y por ende a la toma de decisiones acertadas a la hora del manejo. En Sudamérica son pocos los grupos de investigación dedicados al estudio de *Mollicutes* fitopatógenos, por lo que el estudio de estos patógenos (Fitoplasmas) permitirán también conocer con mayor precisión las relaciones filogenéticas establecidas entre cada uno de ellos, y comprender cuales han sido los caminos evolutivos que han seguido de manera particular y general este grupo de patógenos completando el “mapa” evolutivo de estos patógenos en el planeta.

Dadas las particularidades propias del grupo 16SrXIII, así como la falta de conocimiento que se tiene respecto de los fitoplasmas asociados a dicho grupo presentes en Argentina, se consideró de suma importancia el estudio de estos patógenos asociados al enrojecimiento letal de la frutilla (EL) y al amarillamiento del paraíso, abordando no solo el punto de vista epidemiológico, sino también el molecular, a fin de tener un conocimiento global de ambos patosistemas.

Para un mejor entendimiento las hipótesis, los objetivos generales y específicos, se dividirán en aquellas relacionadas con aspectos epidemiológicos y aspectos moleculares.

2. Hipótesis

2.1 Referidas a la caracterización epidemiológica

Hipótesis 1: La enfermedad conocida como *enrojecimiento letal* de la frutilla (*Fragaria x ananassa*), cuyo agente etiológico es un fitoplasma perteneciente al grupo 16SrXIII (*Strawberry Red Leaf*), afecta lotes de producción de Lules (Tucumán) con una incidencia y prevalencia que depende los cultivares implantados y el origen de los mismos.

Hipótesis 2: El fitoplasma *China tree yellows*, el cual es uno de los agentes etiológico de la enfermedad conocida como *amarillamiento del paraíso* (*Melia azedarach*), tiene en Argentina una distribución restringida al noreste de nuestro país aun cuando el hospedante está presente en otras regiones con condiciones similares.

2.2 Referidas a la caracterización molecular

Hipótesis 3: Los fitoplasmas *Strawberry Red Leaf* y *China tree yellows* presentan distribución exclusivamente sudamericana. Debido al aislamiento geográfico, presentarán relaciones filogenéticas más cercanas con fitoplasmas del grupo 16SrXIII presentes en la región que con fitoplasmas del mismo grupo, pero de ubicación geográfica distinta, lo que puede ser evidenciado mediante el análisis de la secuencia de regiones genómicas conservadas.

Hipótesis 4: Las proteínas inmunodominantes de membrana del fitoplasma *China tree yellows*, posee una secuencia y estructura diferente respecto de fitoplasmas con una ubicación geográfica distinta y distinto grupo 16Sr. A su vez, dado que el dominio extracelular de estas proteínas está relacionado con mecanismos de interacción patógeno-hospedante específicos, la variabilidad de la secuencia en esta región será mayor que en otras regiones.

3. Objetivos generales

3.1 Referidos a la caracterización epidemiológica

Objetivo general 1: Caracterizar los patosistemas *enrojecimiento letal de la frutilla*-fitoplasmas y *amarillamiento del paraíso*-fitoplasmas, en distintas regiones de Argentina haciendo énfasis en la importancia y la distribución geográfica, respectivamente.

3.2 Referidos a la caracterización molecular

Objetivo general 2: Caracterizar desde el punto de vista molecular fitoplasmas del grupo 16SrXIII presentes en Argentina, asociados con los patosistemas *enrojecimiento letal de la frutilla* y *amarillamiento del paraíso*, con énfasis en regiones genómicas involucradas con mecanismos de interacción patógeno-hospedante y regiones genómicas conservadas.

4. Objetivos específicos

4.1 Referidos a la caracterización epidemiológica

Objetivo específico 1: Determinar la presencia e identidad de fitoplasmas asociados a la enfermedad *enrojecimiento letal de la frutilla*. Evaluar la importancia de los mismos en función a su prevalencia e incidencia en lotes productivos de la región de Lules (Tucumán).

Objetivo específico 2: Determinar la presencia e identidad de fitoplasmas asociados a la enfermedad *amarillamiento del paraíso* y estudiar la distribución geográfica del

fitoplasma *China tree yellows*, el cual es uno de los agentes etiológicos asociado a la enfermedad amarillamiento del paraíso, en Argentina.

Objetivo específico 3: Producir un reactivo de diagnóstico, basado en la producción de antisueros con proteínas recombinantes en contra de la proteína secA, tanto para la detección como para la inmunolocalización en tejidos infectados.

4.2 Referidos a la caracterización molecular

Objetivo específico 4: Determinar la variabilidad intra e interespecífica en regiones genómicas conservadas de distintos aislamientos geográficos de los fitoplasmas *Strawberry Red Leaf* y *China tree yellows*, y realizar estudios filogenéticos utilizando las mismas.

Objetivo específico 5: Determinar el tipo, secuencia y estructura de la/las proteínas inmunodominantes de membrana presentes en el fitoplasma *China tree yellows*, establecer estudios comparativos con las de otros fitoplasmas, y determinar la variabilidad existente tanto en los dominios transmembrana como en los dominios extracelulares de las mismas.

Capítulo II

Caracterización epidemiológica de fitoplasmas asociados al cultivo de la frutilla (*Fragaria x ananassa* D.)

1. Introducción

Argentina es uno de los pocos países del hemisferio sur que presenta condiciones climáticas propicias para la producción de plantines de frutilla de alta calidad. Alrededor de 100 millones de plantines son producidos anualmente en viveros de Argentina tanto para el mercado doméstico como para el extranjero (Kirschbaum et al., 2012). En lo que se refiere a la producción de frutilla, los volúmenes exportados por Argentina durante el 2013 alcanzaron las 4.242 toneladas (INDEC), en forma de fruto congelado, siendo los principales destinos EEUU (48% de la producción total) y Brasil (43%). En nuestro país las áreas de producción de frutilla están ubicadas en un amplio rango de latitudes (24°S a 42°S), principalmente en las provincias de Tucumán, Santa Fe, Corrientes y Buenos Aires (Kirschbaum et al., 2000). Según datos de la FAO durante el 2013 se cultivaron alrededor de 1000ha de frutilla en la Argentina, donde la participación de Tucumán fue de 340ha principalmente ubicadas en la localidad de Lules (Informe INTA, 2014). En lo que a exportación de fruta se refiere, esta provincia aportó 1.542 toneladas (36% del total) por un valor cercano a los U\$S 3.1 millones (Reporte Agroindustrial, 2014). En nuestro país, la producción de frutilla se basa típicamente en plantas frescas sin hojas y frigo (plantines arrancados en invierno y conservados en cámara frigorífica). La demanda de plantines de frutilla se estima en 50 millones anuales. El mercado argentino cuenta con viveros comerciales tanto para suplir la demanda interna como para la exportación. Los viveros se localizan en las localidades de Trevelín, Esquel y El Maitén (provincia de Chubut), en los Antiguos (Santa Cruz), Plottier (Neuquen) y en Tafí del Valle (Tucumán). Los plantines importados provienen de Estados Unidos y Europa (especialmente como plantas "frigo"). La producción argentina de frutillas recurre primariamente a variedades obtenidas por la Universidad de California, aunque la oferta de materiales desarrollados por la Universidad de Florida y empresas españolas se ha incrementado notoriamente en los últimos años. Los cultivares más utilizados son Camarosa, Chandler, Sweet Charlie y Tudla Milsei. Entre otras de menor importancia, se menciona Oso Grande, Selva, Seascape, Pájaro, Heidi y Rosalinda (Molina et al., 2007).

De las distintas enfermedades que pueden afectar al cultivo de la frutilla, los patógenos cuya ubicación se encuentra restringida al floema, entre los que se mencionan

a los fitoplasmas (Harrison et al., 1997; Jomantiene et al., 1998, 1999, 2001; Padovan et al., 2000; Fernández et al., 2013) han sido reportados en todas las áreas productoras del mundo ocasionando diversas enfermedades (Mass, 1998). Los sistemas para el diagnóstico de fitoplasmas se basan principalmente en el empleo de técnicas de biología molecular, siendo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) la más ampliamente difundida (Lee et al., 2000; Nejat y Vadamalai, 2013). En frutilla, al igual que en otros *berries*, la presencia de metabolitos secundarios tales como polifenoles, taninos y polisacáridos suelen inhibir la reacción de la enzima polimerasa en las reacciones de PCR (Porebski et al., 1997). Es por ello que contar con ADN de calidad (ausente de inhibidores), es el primer paso en el desarrollo de un sistema para el diagnóstico preciso de estos patógenos en frutilla.

Dado que en muchos casos la concentración de fitoplasmas en los tejidos infectados no solo es baja, sino irregularmente distribuida en la planta, la detección mediante PCR directo suele ser deficiente y generar la presencia de falsos negativos (PCR negativos en muestras infectadas). Para mejorar la certeza del PCR directo en la detección de fitoplasmas, se utiliza una segunda ronda de amplificación o PCR anidado en donde se emplea un segundo par de cebadores que hibridan por dentro de la región amplificada en la primera ronda (PCR directo), los cuales generan así un fragmento de menor tamaño. En el caso de los fitoplasmas, esta técnica es ampliamente usada (Lee et al., 1998a), y se ha demostrado que el PCR anidado es entre 10-100 veces más sensitivo que el PCR directo (Berg et al., 1999).

Debido a que hasta el momento no se han podido cultivar *in vitro* a los fitoplasmas, el esquema de clasificación de los mismos se basa en el análisis de los patrones de restricción o RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) de un fragmento interno del gen 16S rDNA amplificado mediante PCR (Lee et al., 1998a). En este esquema, se emplea un fragmento interno de 1.241pb (~1.2kb) del gen 16S rDNA amplificado con un juego de cebadores universales para fitoplasmas (Lee et al., 1993), el cual es sometido a la digestión con 17 nucleasas (Lee et al., 1998a). En la actualidad, el análisis de los patrones de restricción, ya sea por los métodos convencionales o mediante el análisis *in silico* (softwares específicos que determinan los patrones RFLP mediante el análisis de la secuencia del gen 16Sr DNA), ha permitido distinguir unos 33

grupos 16Sr y más de 120 subgrupos (Zhao et al., 2009a). Con respecto a la frutilla y en base al esquema de clasificación propuesto, actualmente se conocen al menos 6 grupos 16Sr de fitoplasmas que afectan dicho cultivo (16SrI, 16SrIII, 16SrVI, 16SrVII, 16SrXII y 16SrXIII) (Harrison et al., 1997; Jomantiene et al., 1998, 1999, 2001; Padovan et al., 2000; Valiunas et al., 2006; Fernández et al., 2013b).

En Argentina, la enfermedad conocida como *Enrojecimiento Letal* (EL) comenzó a detectarse en los años 2005-2006 asociada a plantas de frutilla en diversos lotes de la región de Lules (Tucumán). Las plantas enfermas exhiben una sintomatología que se caracteriza por una marcada disminución en el tamaño de la planta o achaparramiento, hojas maduras abarquilladas con su cara adaxial de color rojizo, hojas jóvenes emergentes disminuidas en tamaño y con amarillamiento hacia el borde de la lámina, seguido por la pérdida y deformación de flores y frutos, necrosis y por último la muerte de la planta. Durante el año 2007, se analizaron muestras de frutilla con dicha sintomatología provenientes de Lules determinándose la presencia de un fitoplasma asociado a las mismas. El análisis de los patrones PCR-RFLP y la secuencia del gen 16S rDNA, determinaron que se trataba de un fitoplasma perteneciente al grupo 16SrXIII, aunque diferencias en los patrones de varias enzimas presuponían que se trataba de un nuevo subgrupo aún no descrito (Fernández et al., 2008a, b). Hasta el momento de la realización de este trabajo de tesis se desconoce cuál es el grado de afectación que presenta dicho cultivo (incidencia/prevalencia) y cuál es la relación entre la presencia de fitoplasmas y la presencia de la enfermedad. Por otra parte se desconoce si en realidad se trata de un solo fitoplasma o si existen más especies involucradas. Dada esta falta de conocimiento en estos aspectos referidos al patosistema *fitoplasma-frutilla* se propone como objetivo del presente capítulo:

- **Objetivo específico 1:** Determinar la presencia e identidad de fitoplasmas asociados a la enfermedad *enrojecimiento letal de la frutilla*. Evaluar la importancia de los mismos en función a su prevalencia e incidencia en lotes productivos de la región de Lules (Tucumán).

2. Materiales y métodos

- **Puesta a punto de un sistema de diagnóstico de fitoplasmas en frutilla mediante PCR del gen 16S rDNA**

2.1 Recolección de material sintomático a campo

Con la finalidad de disponer de inóculos en invernadero y poner a punto un sistema de diagnóstico de fitoplasmas en frutilla, se recolectaron ejemplares con sintomatología de *Enrojecimiento Letal* en lotes productivos de Lules (Tucumán), Bella Vista (Corrientes) y durante los años 2009-2010. Los ejemplares fueron trasplantados en invernadero bajo condiciones controladas de temperatura y humedad. Porciones de peciolo y nervadura central se mantuvieron a -20°C para su posterior uso.

2.2 Ensayos de transmisión experimental mediante *Cuscuta subinclusa* y mediante injerto del foliolo medio

Con la finalidad de obtener y mantener inóculos viables de los fitoplasmas en estudio, así como evaluar la sintomatología ocasionada en hospedantes alternativos, se realizaron ensayos de transmisión controlada. Para la transmisión del patógeno a vinca (*Catharanthus roseus*) se utilizó el holoparasito *Cuscuta subinclusa*, para transmitir fitoplasmas desde una planta infectada hacia una planta sana. Para la transmisión se colocaron pequeñas porciones de *C. subinclusa* (3-5 cm de largo), mantenidas en ejemplares sanos, sobre el peciolo de ejemplares de frutilla con sintomatología sospechosa de fitoplasmas. Una vez que el holoparásitose adhirió sobre la planta de frutilla, se colocaron plantas de vinca en cercanías de estas y se permite la adhesión del mismo, generando así un puente que conecta ambas plantas. Se evaluó el desarrollo de la sintomatología en períodos de 15 días aproximadamente y se corroboró la presencia de fitoplasmas mediante PCR.

Para la transmisión a ejemplares de frutillas indicadoras *Fragaria vesca* UC5 (Frazier, 1974) se empleó la técnica de injerto del peciolo medio. Para ello se tomó el peciolo medio de planta de frutilla sintomática y se injertó sobre la misma posición (peciolo medio previamente extraído) de *F. vesca* UC5. El injerto se mantuvo adherido mediante Parafilm® y se lo conservó en cámara húmeda durante 7 días. Se evaluó la

presencia de sintomatología emergente y se evaluó la presencia de fitoplasmas mediante PCR.

2.3 Extracción de ADN total

Para la puesta a punto de un sistema de extracción de ADN, se ensayaron diferentes variaciones del protocolo de Doyle y Doyle (1990) con el objetivo de minimizar la presencia de compuestos inhibidores de la PCR. En este ensayo se utilizaron 10 plantas (n=10) de frutilla *Fragaria x ananassa* Duch. cv. Camarosa del mismo estado fenológico y se probaron 4 tratamientos: 1) Protocolo Doyle y Doyle (Control), y tres modificaciones del control (modificación 1, 2 y 3). En el protocolo control se molieron 0,5 g de tejido con la ayuda de aire líquido, de los cuales se colocaron aproximadamente 50 mg en un tubo y se agregó 500 µl de buffer CTAB (2% CTAB; 0,2% 2-mercaptoetanol; 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA; 100 mM Tris-HCl pH 8,00). Después de incubar durante 30 min a 65 °C en baño térmico, se hizo una extracción con 1 vol. de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1 v/v), centrifugando a 10.000 rpm por 10 min a 4 °C. Se extrajo el sobrenadante y se precipitó con 0,7 vol. de isopropanol centrifugando a 12.000 rpm por 30 min. Se secó el pellet y resuspendió en 100 µl de H₂O_{mq} (H₂O ultra pura, MILI-Q®). Se comprobó la calidad del ADN extraído y la cantidad, mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%/buffer TAE1X (40mM Tris-HCl, 20mM Acido Acético y 1mM EDTA), los cuales fueron teñidos con bromuro de etidio (10mg/ml) y visualizados bajo transiluminador UV. En la **modificación 1** se realizó un doble lavado con cloroformo: alcohol isoamílico (24:1 v/v), en la **modificación 2** se realizó también un doble lavado con cloroformo: alcohol isoamílico (24:1 v/v) y se agregó PVPP (Polyvinilpolypirrolidona, Sigma) en la muestra fresca, mientras que en la **modificación 3** se repitió el doble lavado, el agregado de PVPP, se sumó una incubación al sobrenadante del segundo lavado con NaCl 2M y la precipitación final se realizó con AcNa 3M (10%) y 2 volúmenes de etanol helado. Otra posibilidad es mediante la dilución de la muestra, aprovechando la gran sensibilidad de la técnica de PCR, de manera que se diluyan los componentes inhibitorios y que la cantidad de ADN blanco sea suficiente para la amplificación. El ADN obtenido en cada uno de los procedimientos de extracción mencionados se los probó en tres diluciones (1/1; 1/2 y 1/4)

para establecer cuál podría ser la concentración adecuada entre inhibidores y ADN blanco.

Por otro lado, para evaluar el mejor tejido para realizar la extracción con menor cantidad de inhibidores en la PCR se trabajó con 36 plantas recolectadas a campo a las cuales se realizó extracción mediante Doyle y Doyle (1990) clásico sin modificaciones, a partir de cáliz, hoja completa y peciolo más nervadura central.

En ambos ensayos, tanto aquel en el que se probó el mejor protocolo de extracción como aquel en el que se ensayó el mejor tejido, se evaluó la presencia de compuestos inhibidores mediante el uso de *primers* universales de fitoplasmas tal como se describe en 2.4.

2.4 Determinación de la calidad del ADN: prueba de inhibición

La prueba de inhibición permite determinar si existen compuestos en la muestra que inhiben la actividad de la polimerasa. En esta prueba, se utiliza como molde el ADN de la muestra a evaluar en combinación con ADN de una muestra positiva para fitoplasma que no presente inhibición (previamente evaluado). De esta forma, las reacciones que amplifiquen fragmentos del tamaño deseado y con la misma intensidad que el control positivo (ADN sin inhibición), se considera que no presentan inhibición mientras aquellas reacciones en donde no haya habido amplificación, o está fuese de menor intensidad que la del control, serán consideradas muestras con inhibición. Este procedimiento se empleó para evaluar tejidos y protocolos de extracción para emplear en la detección de fitoplasmas en frutilla mediante PCR, en forma masiva.

Para las pruebas de inhibición las reacciones de PCR se llevaron a cabo utilizando los *primers* P1/P7 (universales para fitoplasmas), bajo las condiciones descritas en 2.5.

2.5 Detección de fitoplasmas mediante PCR en plantas de frutilla con sintomatología de *EL* (Enrojecimiento Letal): condiciones y *primers* empleados

Todas las muestras de ADN fueron evaluadas mediante PCR directo/anidado, (Figura 2.1). Se emplearon dos juegos de *primers*: P1/P7 para PCR directo (1.8kb; gen 16S rDNA, región espaciadora 16S-23S y extremo 5' del gen 23S rDNA) (Deng y Hiruki

1991; Schneider et al. 1995) y R16F2n/R16R2 para la segunda ronda en el PCR anidado (porción interna del gen 16S rDNA) (Lee et al., 1993) (Tabla 2.1).

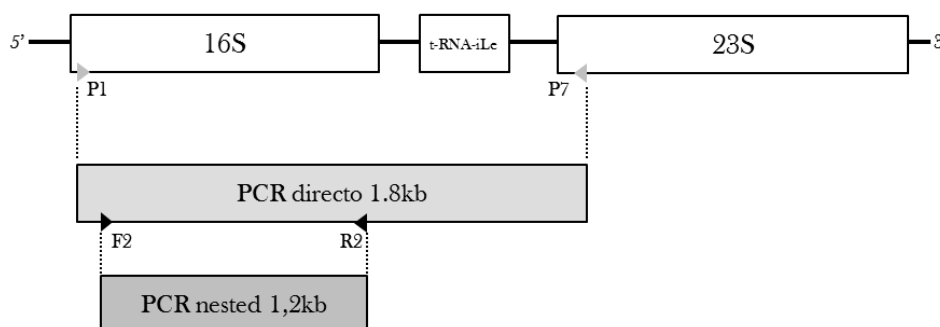


Figura 2.1: Esquema representativo del operón rRNA y los sitios de hibridación de *primers* universales para fitoplasmas y sus respectivos productos de amplificación. 16S: gen 16s rDNA, t-RNA-Ile: región que codifica al RNAt de la isoleucina, 23S: gen 23S rDNA. P1/P7: sitio de hibridación del juego de cebadores empleados en las reacciones de PCR directo (amplificación 1.8kb) y F2/R2: sitio de hibridación del juego de cebadores internos (PCR *nested*/anidado) (amplificación 1.2kb).

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 40 μ L conteniendo 1U de GoTaq® DNA polymerase (Promega, USA), 0.4 μ M de cada primer, 100 μ M de dNTP's y 7.5mM de MgCl₂ tanto para las reacciones de PCR directo como las de PCR nested. Las condiciones empleadas para el juego de *primers* P1/P7 (PCR directo) fueron: 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 segundos (3 minutos para el primer ciclo), hibridación a 55°C por 1 minuto y extensión a 72°C por 2 minutos (5 minutos para la extensión final). Como control positivo se emplearon 50ng de ADN del fitoplasma *Argentinean Catharanthus Litle Leaf ACLL* (Torres et al., 2011), el cual se mantiene mediante injertos en plantas de vinca. Como controles negativos se emplearon por un lado ADN de frutilla asintomática (para determinar si existen amplificaciones a partir de ADN del hospedante) y tubos sin ADN (para determinar la existencia de contaminación en los componentes de la PCR, sobre todo en la técnica de PCR anidado).

Por su parte, para el juego de cebadores R16F2n/R16R2 (PCR anidado) se empleó como ADN molde 1 μ l de una dilución 1:25 del producto amplificado con los *primers* P1/P7. Las condiciones de ciclado fueron las siguientes: 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 2 minutos (3 minutos para el primer ciclo), hibridación a 54°C por 1 minuto y extensión a 72°C por 2 minutos (5 minutos para la extensión final). Como control

positivo, se emplearon 50ng de ADN del fitoplasma ACLL (Torres et al., 2011), el cual se mantiene mediante injertos en plantas de vinca. Como controles negativos se empleó 1µl de una dilución 1:25 a partir del producto amplificado con los *primers* P1/P7 de frutilla asintomática y de tubos sin ADN.

Tabla 2.1: Listado de *primers* empleados en la detección de fitoplasmas en frutilla.

| cebador | Secuencia | referencia |
|---------------|---------------------------------|------------------------|
| P1 | 5'-AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT-3' | Deng y Hiruki, 1991 |
| P7 | 5'-CGTCCTTCATCGGCTCTT-3' | Schneider et al., 1995 |
| R16F2n | 5'-GAAACGACTGCTAAGACTGG-3' | Lee et al., 1993 |
| R16R2 | 5'-CGGCGGTGTGTACAAACCCCG-3' | Lee et al., 1993 |

2.6 Identificación preliminar de fitoplasmas mediante PCR-RFLP

Las muestras positivas por PCR anidado fueron analizadas mediante PCR-RFLP. El producto amplificado con los *primers* R16F2n/R16R2 (1240pb) fue digerido con la endonucleasa *MseI* (NEB, USA) la cual genera patrones que permiten diferenciar de manera preliminar los 4 grupos 16Sr que hasta el momento han sido registrados en la Argentina. Cada reacción se llevó a cabo en un volumen final de 20µl conteniendo 100-200 ng de producto de PCR, 5U de la enzima *MseI*, NEBuffer 2 1X y H₂Omq hasta completar el volumen. Posteriormente las reacciones se incubaron a 37°C durante 4 horas. Los patrones RFLP se resolvieron en geles de agarosa 1.5% (Biodynamics SRL, Argentina) + 0.5% agarosa Metaphor (BioWittaker Molecular Applications, UK) o en geles de poliacrilamida al 8%. Las muestras con patrón *MseI* típico del grupo 16SrXIII, fueron analizadas con otras enzimas de restricción propuestas por Lee y col. (1998a). Aquellas muestras cuyo patrón *MseI* no coincidieron con el del grupo 16SrXIII, fueron analizadas de manera separada, empleando distintas enzimas de restricción (Lee et al., 1998).

- **Análisis de la incidencia y prevalencia de la enfermedad de *Enrojecimiento Letal* (EL) y su relación con la presencia de fitoplasmas**

2.7 Muestreos en lotes de producción de frutilla en Lules (Tucumán)

Durante los años 2010, 2011 y 2012 se realizaron muestreos contabilizando un total de 61 lotes, los que en conjunto abarcaron una superficie aproximada de 96 hectáreas. Los muestreos se realizaron en la región productiva de Lules (Tucumán), entre los meses agosto-octubre, período en el que se registra la mayor cantidad de plantas con sintomatología de *Enrojecimiento Letal (EL)* (Figura 2.2).

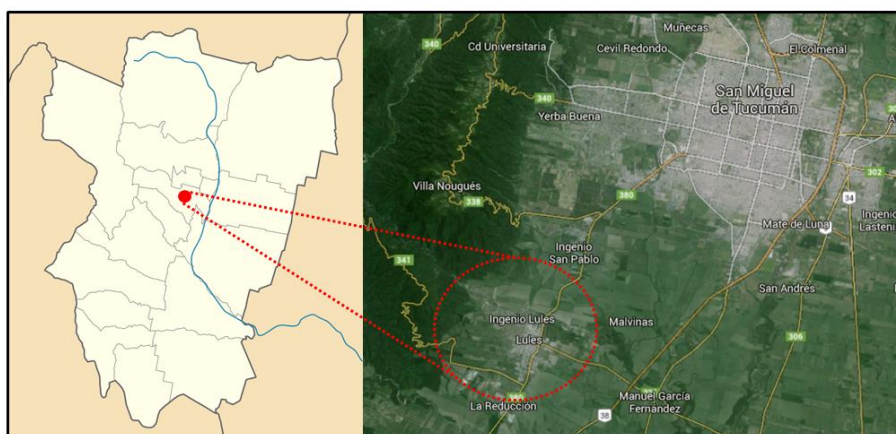


Figura 2.2: Muestreo de prospección del *Enrojecimiento Letal* de la frutilla. A: ubicación de la Localidad de Lules dentro de la provincia de Tucumán; B: imagen satelital en donde se muestra con detalle la zona correspondiente al sitio de muestreo (imagen tomada desde el google maps, www.google.com.ar/maps)

La contabilización y la recolección de muestras con sintomatología de *EL* se realizó sobre transectas constituidas por 100 plantas. En cada lote, los surcos de siembra fueron numerados y se eligieron aquellos en donde se dispusieron las transectas (entre 3-5 transectas por lote) mediante tablas de números al azar. En cada una de estas se contabilizó el número de plantas con sintomatología de *EL*, tomándose muestras de cada una de ellas para ser analizadas mediante PCR anidado (siguiendo las condiciones propuestas en 2.5). También se analizaron plantas que presentaron otro síntoma, presumible de ser causado por fitoplasmas. Los lotes fueron diferenciados en función al cultivar implantado y en cada uno de ellos, se registró la superficie (ha) y el origen de los plantines (viveros). Fuera del muestreo, se recolectaron ejemplares sintomáticos los que también fueron analizados por PCRn (Figura 2.3).

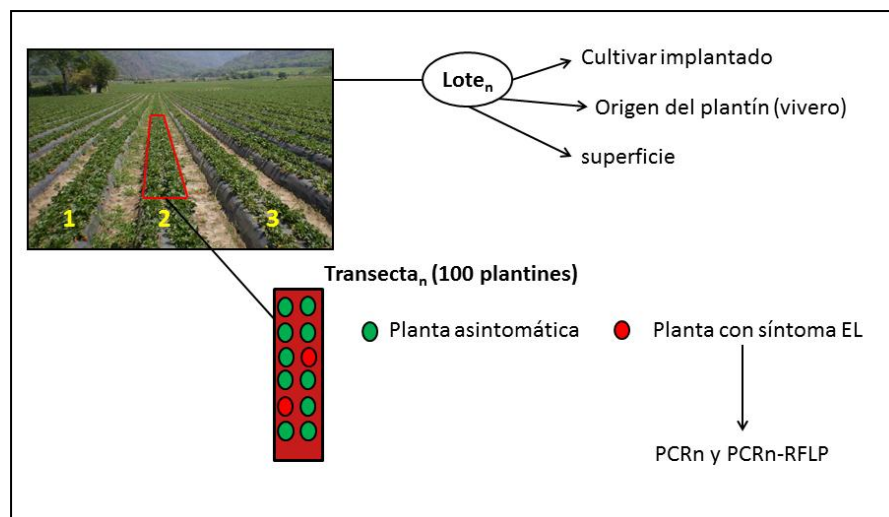


Figura 2.3: Esquema representativo del mecanismo de muestreo para la enfermedad del *Enrojecimiento Letal* de la frutilla. En cada lote se registró el cultivar, origen y superficie. Los camellones de cada lote fueron numerados y se eligieron aquellos en donde se dispondrían las transecta por tabla de números al azar. En cada transecta, constituida por 100 plantas, se contabilizaron las plantas con síntoma *EL* y se tomó muestra de cada una de ellas para su análisis en laboratorio mediante PCRn.

2.8 Análisis estadístico

2.8.1 Relación entre la Incidencia y Prevalencia de la enfermedad *EL* respecto al cultivar y al origen de los plantines.

En cada lote se registraron datos acerca de la procedencia de los plantines (viveros de origen) y cultivares implantados, con el objetivo de determinar si existe algún grado de relación entre estas variables y la proporción entre plantas con síntoma de *EL* y plantas sanas respecto al número total de plantas analizadas (Incidencia). Dado que las variables cultivar y origen son del tipo nominal (variables categorizadas sin ordenamiento natural) se las analizó estadísticamente mediante tablas de contingencia para poner a prueba la hipótesis (h_0) de igualdad de proporciones (proporción de plantas *EL* según origen o según cultivar). Se estableció el número total de plantas analizadas (N), número total de plantas con sintomatología de *EL* (n_{EL}) y número total de plantas n_{EL} positivas para fitoplasmas mediante PCR (n_{EL} PCR +) para cada una de las combinaciones cultivar x origen, es decir cada lote representado por un cultivar y un origen (Anexo, tabla 1). Para el análisis estadístico, se contemplaron solo aquellos cultivares y orígenes que hubieran presentado ejemplares con sintomatología de *EL*. Tanto para los distintos cultivares analizados como para los orígenes, se establecieron las frecuencias de cada uno de ellos respecto al número de plantas con *EL* (n_{EL}) y número de plantas asintomáticas (no_{EL}) (tablas 2.7/2.9 respectivamente) Para el análisis

se utilizó el software InfoStat (versión 2014) a partir del cual se obtuvieron los valores de los estadísticos Chi-cuadrado (Pearson) y el valor de probabilidad asociado (p) para poner a prueba la h_0 . En caso de rechazo de la h_0 ($p < 0.05$) (las proporciones son estadísticamente diferentes), se procedió con el cálculo de *odd ratios* (Θ) entre variedades u orígenes en tablas 2x2, comparando de a dos variedades u orígenes por vez. El valor de Θ representa la chance de que una variedad u origen dado presente una planta con síntoma, o con fitoplasmas, respecto de otra variedad u origen. El mismo procedimiento estadístico se empleó para la prevalencia, es decir la relación entre el número de lotes con al menos una planta sintomática o enferma con fitoplasmas respecto al número total de lotes analizados y las variables de clasificación (cultivar y origen).

2.8.2 Relación entre la proporción entre plantas infectadas con fitoplasmas y presencia del síntoma *EL*.

Con el fin de determinar si la presencia de fitoplasmas está correlacionada estadísticamente con el desarrollo de sintomatología *EL* se llevó a cabo un análisis estadístico de tablas de contingencia. En este análisis se tuvo en cuenta la proporción de plantas con sintomatología *EL* y el resultado del PCR anidado. Por su parte también se evaluó la proporción de plantas enfermas con fitoplasmas en plantas de frutilla asintomáticas que fueron recolectadas a lo largo de los muestreos y las cuales fueron analizadas también mediante PCR anidado a igual que las plantas *EL*. Teniendo en cuenta que las variables analizadas también son del tipo nominales (presencia/ausencia del síntoma; PCR positiva/PCR negativa) se utilizó un análisis estadístico de tablas de contingencia 2x2. En estas tablas de contingencia se obtuvieron las frecuencias para cada una de las combinaciones posibles (presencia/ausencia síntoma x PCR positivo/PCR negativo). Mediante el software InfoStat (versión 2014) se calcularon el estadístico Chi-cuadrado (pearson) y el valor de probabilidad (p) asociado para poner a prueba la h_0 (de igualdad de proporciones).

3. Resultados

3.1 Recolección de material sintomático a campo

Durante los años 2009 y 2010 se muestrearon 27 lotes de producción de frutilla en las localidades de Bella Vista (Corrientes) y Lules (Tucumán). Se lograron recolectar 41 ejemplares de frutilla con sintomatología típica de *EL* (Tabla 2.5). La sintomatología encontrada a campo se caracterizó por la presencia de un notable achaparramiento de la planta, acompañado por un abarquillamiento y enrojecimiento de la cara abaxial en hojas maduras, amarillamiento en los extremos de las hojas jóvenes, en algunos casos deformación en flores y frutos y por último necrosis y muerte de la planta (Figura 2.4).



Figura 2.4: Plantas de frutilla a campo mostrando sintomatología *EL*. A: planta mostrando síntomas de achaparramiento y enrojecimiento de hojas maduras; B: comparación entre una planta con típico síntoma *EL* y planta sana, C: planta con marcado achaparramiento en comparación con sus pares asintomáticos y D: detalle del amarillamiento encontrado en el borde de las hojas jóvenes.

Tabla 2.2: Ejemplares de frutilla con sintomatología de *EL* recolectados a campo período 2009-2010.

| Síntoma | Procedencia | Nº muestras recolectadas |
|-----------|--------------------------|--------------------------|
| <i>EL</i> | Lules (Tucumán) | 29 |
| <i>EL</i> | Bella Vista (Corrientes) | 12 |
| | Total | 41 |

3.2 Ensayos de transmisión experimental

Se realizaron 14 ensayos de transmisión por *Cuscuta subinclusa* a vinca y 21 de folíolos medios a *Fragaria vesca* UC5 (Figura 2.5). En ninguno de los dos casos se logró transmitir fitoplasmas a dichas especies. Estos resultados estarían relacionados con una baja concentración de fitoplasmas en los ejemplares de frutilla analizados y con la rápida muerte de los mismos, lo que otorga un tiempo acotado para llevar a cabo la transmisión, que por otra parte es poco eficiente debido al injerto interespecífico y pondría de manifiesto la escasa afinidad que tiene *C. subinclusa* para parasitar plantas de frutilla.



Figura 2.5: Ensayos de transmisión mediante *Cuscuta subinclusa* (A) y por injerto de folíolo medio a *Fragaria vesca* (B).

3.3 Extracción de ADN total y prueba de inhibición

Se realizaron extracciones de ADN total de planta de acuerdo a lo propuesto en la metodología. Cada muestra fue sometida a una prueba de inhibición y se comprobó cual es el protocolo que menor cantidad de compuestos inhibidores de la polimerasa presenta (Tabla 2.3). Los resultados demuestran que la modificación 2 (agregado de PVPP en la molienda de la muestra + doble pasaje por alcohol:isoamilico 24:1) es la que menor proporción de inhibición presenta. De un total de 10 muestras analizadas, en cada una

de las 3 diluciones (n=30) solo 8 (8/30) resultaron con inhibición. La proporción más elevada coincide con ADN puro sin diluir. En la dilución 1/4 la inhibición en las 10 muestras analizadas desaparece. Esta modificación fue entonces la implementada a la hora de analizar las muestras de frutilla en los estudios epidemiológicos.

Tabla 2.3: Proporción de muestras PCR positivas sobre los 10 ejemplares analizados para cada método de extracción y cada dilución de ADN empleado. En cada tubo de reacción se agregó 1ul de ADN problema de frutilla y 1ul de ADN de vinca infectada para establecer el grado de inhibición en cada muestra.*: dilución de ADN en H₂Omq.

| Dilución ADN* | Doyle & Doyle | Modificación 1 | Modificación 2 | Modificación 3 |
|---------------|---------------------------------|----------------|----------------|----------------|
| 1:1 | 0 ^a /10 ^b | 4/10 | 5/10 | 3/10 |
| 1:2 | 3/10 | 6/10 | 7/10 | 6/10 |
| 1:4 | 5/10 | 7/10 | 10/10 | 7/10 |
| total | 8/30 | 17/30 | 22/30 | 16/30 |

A su vez el tejido con menor cantidad de inhibición sobre la PCR fue el peciolo + nervadura central (Tabla 2.4). En este caso, se analizaron 36 muestras de frutilla provenientes de campo en el mismo estado fenológico. De las 36 muestras analizadas solo 4 presentaron inhibición (11%), mientras que para el tejido hoja fueron 15 (42%) y para el tejido cáliz fueron 13 (36%). El tejido peciolo + nervadura central fue entonces el elegido para el análisis de las muestras de frutilla en los estudios de epidemiología.

Tabla 2.4: Proporción de muestras PCR positivas sobre los 36 ejemplares para los tejidos analizados (cáliz, hoja y peciolo más nervadura central). En cada tubo de reacción se agregó 1ul de ADN problema de frutilla y 1ul de ADN de vinca infectada para establecer el grado de inhibición en cada muestra.

| Dilución | Cáliz | Hoja | peciolo + nervadura |
|----------|-------|-------|---------------------|
| 1:1 | 23/36 | 21/36 | 32/36 |

3.4 Detección de fitoplasmas en plantas con sintomatología *EL* (Enrojecimiento Letal) mediante PCR *nested*

Se extrajo el ADN a partir del peciolo + nervadura central de las 41 muestras recolectadas, siguiendo el protocolo modificado de extracción N° 2. De las 41 muestras analizadas, ninguna amplificó bandas del tamaño esperado mediante PCR directo,

mientras que para PCRn 8 resultaron positivas (19,51%). No se observó la presencia de inhibición en las muestras, y no se registraron amplificaciones en ninguno de los controles negativos.

3.5 Identificación preliminar de fitoplasmas mediante PCR-RFLP

A partir del producto amplificado con los *primers* R16F2n/R16R2 (1240pb), las 8 muestras con sintomatología de *EL* PCRn (+) fueron sometidas a la digestión con la enzima *MseI*. De las 8 muestras analizadas 3 resultaron con el patrón *MseI* perteneciente al grupo 16SrIII, todas provenientes de Lules. De las 5 restantes, provenientes de Bella Vista, 2 muestras se correspondieron al grupo 16SrVII y 3 al grupo 16SrXIII (Tabla 2.5). Los patrones *MseI* característicos de cada uno de los grupos descritos se muestran en la figura 2.6.

Tabla 2.5: Identificación preliminar de los distintos aislamientos PCRn positivos para fitoplasmas según el patrón PCR-RFLP con la enzima *MseI*. EL-Tc: aislamientos enrojecimiento letal Lules, EL-BV: aislamientos enrojecimiento letal Bella Vista, N°: número total de ejemplares analizados, PCRn(+): número de ejemplares positivos para PCR nested. *MseI*: grupo 16Sr según patrón de restricción con la enzima *MseI* del producto amplificado con los *primers* R16F2n/R16R2

| Localidad | Síntoma | N° | PCRn (+) | <i>MseI</i> | Identificación de los aislamientos |
|-------------|-----------|----|----------|-------------|------------------------------------|
| Lules | <i>EL</i> | 29 | 3 | 16SrIII | EL-Tc2;EL-Tc3; EL-Tc4 |
| Bella Vista | <i>EL</i> | 12 | 3 | 16SrXIII | EL-BV1; EL-BV2;EL-BV-5 |
| | | | 2 | 16SrVII | EL-BV3;EL-BV6 |

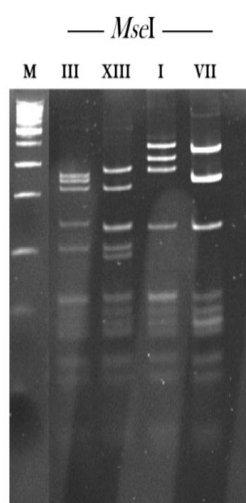


Figura 2.6: Patrón RFLP del producto amplificado con los *primers* R16F2n/R16R2 (1240pb) y digerido con la enzima *MseI*. Se observan los patrones diferenciales de 4 grupos 16Sr. **III**: fitoplasma ChTDIII (grupo 16SrIII), **XIII**: patrón del fitoplasma ChTYXIII (grupo 16SrXIII), **I**: patrón del fitoplasma ACLL (grupo 16SrI) y **VII**: patrón del fitoplasma ArAWB (grupo 16SrVII).

Para analizar con mayor detalle cada uno de los aislamientos se los separó según el patrón PCR-RFLP de la enzima *MseI*, y se obtuvieron los patrones con otras enzimas que permiten discriminar con mayor precisión dentro de cada grupo 16Sr particular.

- Aislamientos relacionados al grupo 16SrXIII

Se eligieron los aislamientos EL-BV1 y EL-BV2 como representativos del grupo 16SrXIII (según enzima *MseI*) y se analizaron los patrones RFLP con las enzimas *KpnI*, *HaeIII*, *HpaII*, *BstUI* (Figura 2.7), *AluI* y *RsaI* (Figura 2.8) (NEB, USA) siguiendo las condiciones previamente establecidas (Materiales y métodos 2.5).

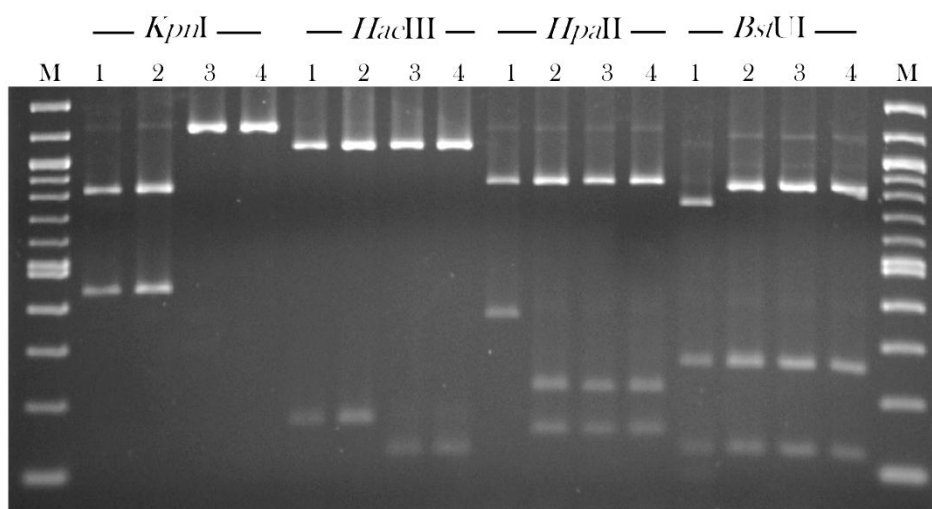


Figura 2.7: Patrones RFLP del producto de amplificación con los *primers* R16F2n/R16R2 del aislamiento EL-BV1 (4) y las cepas de referencia de los subgrupos 16SrXIII-A (MPV)(1), 16SrXIII-C (ChTYXIII) (2) y 16SrXIII (StrawRL) (3) empleando las enzimas *KpnI*, *HaeIII*, *HpaII* y *BstUI*. M: marcador de peso molecular 100pb DNA ladder (NEB): 100, 200, 300, 400, 500, 517, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200 y 1517pb.

Estas enzimas generan un patrón único que permite diferenciar subgrupos 16SrXIII-A y 16SrXIII-C. Como cepas de referencia se emplearon los fitoplasmas *Mexican periwinkle virescece*-MPV (16SrXIII-A), *China tree yellows*-ChTYXIII (16SrXIII-C) y por último el fitoplasma *Strawberry Red Leaf*-StrawRL (16SrXIII) subgrupo sin definir asociado al síntoma de *EL* previamente descrito (Fernández et al., 2008a, b). Los patrones de los dos aislamientos analizados (EL-BV1/BV2) fueron idénticos y es por ello que se muestra solo uno en los geles (Figura 2.6). El patrón RFLP para los dos aislamientos analizados fue 100% idéntico con el del fitoplasma StrawRL. Las similitudes a nivel de los patrones RFLP entre EL-BV1/EL-BV2 y el fitoplasma StrawRL, estarían indicando que todos ellos constituyen aislamientos de un mismo

fitoplasma. Para entender con mayor profundidad la relación entre los aislamientos EL-BV1/EL-BV2 y el fitoplasma StrawRL, se secuenció una porción interna del gen 16S rDNA en ambos aislamientos y se resecuenciaron los aislamientos del fitoplasma StrawRL-Tc1 y StrawRL-Tc7 (ambos de Lules, Tucumán). Los resultados de dicho análisis se muestran en el Capítulo V.

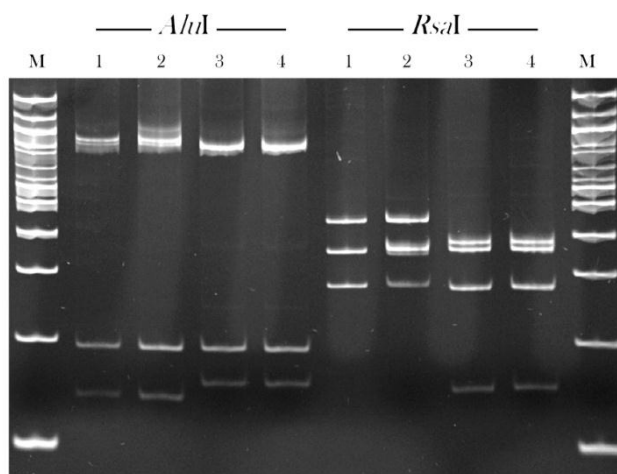


Figura 2.8: Patrones RFLP del producto de amplificación con los *primers* R16F2n/R16R2 del aislamiento StrawRL-BV1 (4) y las cepas de referencia de los subgrupos 16SrXIII-A (MPV)(1), 16SrXIII-C (ChTYXIII) (2) y 16SrXIII (StrawRL) (3) empleando las enzimas *AluI* y *RsaI*. M: marcador de peso molecular 100pb DNA ladder (NEB)

- Aislamientos relacionados al grupo 16SrIII

Para los aislamientos con patrón *MseI* tipo grupo 16SrIII (o grupo X-disease) se realizaron digestiones del producto de PCR con la enzima *HhaI* (NEB, USA), la cual permite diferenciar los subgrupos 16SrIII-B y 16SrIII-J, ambos detectados previamente en Argentina. Se siguieron las condiciones de restricción previamente establecidas (Materiales y métodos 2.5). Los patrones de los 3 aislamientos analizados con dicha enzima coinciden con los del subgrupo 16SrIII-B (Figura 2.9). Para completar su clasificación se procedió con el análisis de la secuencia del gen 16S rDNA de dos aislamientos EL-Tc2 y EL-Tc4, lo cual se desarrollara en el Capítulo V.

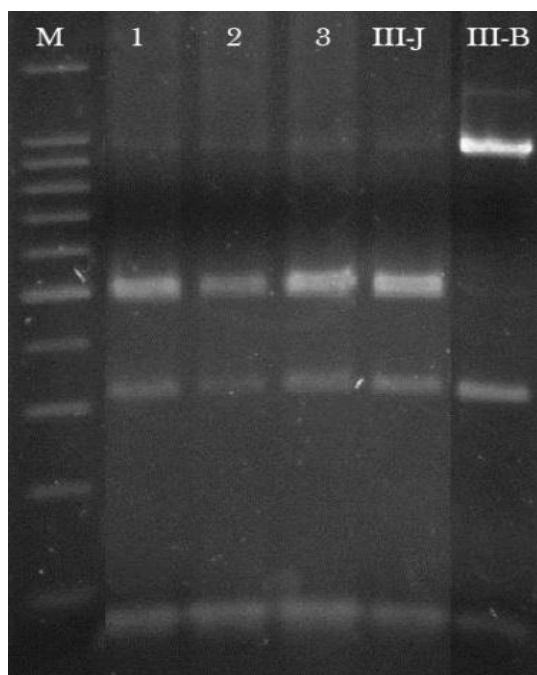


Figura 2.8: Patrones RFLP del producto de amplificación con los *primers* R16F2n/R16R2 de los aislamientos EL-Tc2, EL-Tc3 y EL-Tc4 y los fitoplasmas GDIII (16SrIII-J) y ChTDIII (III-B) con la enzima *HhaI*. **M**= marcador de peso molecular 100pb DNA ladder (NEB).

- Aislamientos relacionados al grupo 16SrVII

Se compararon los patrones RFLP del aislamiento EL-BV3 respecto de los fitoplasmas Argentinean alfalfa witches' broom (ArAWB, 16SrVII-C) (Conci et al., 2005) y Argentinean strawberry phyllody (ASP, 16SrVII-C) (Fernández et al., 2013b) empleando las enzimas *AluI*, *MseI*, *HinfI* y *HhaI* (NEB, USA) tal como se mencionara anteriormente (Materiales y métodos 2.5). Estas enzimas permiten caracterizar al subgrupo 16SrVII-C, (Figura 2.9) y separarlo de los subgrupos 16SrVII-A y 16SrVII-B. Los patrones observados fueron idénticos para las enzimas ensayadas por lo que se deduce que el aislamiento EL-BV3 pertenece al subgrupo 16SrVII-C. Para completar su clasificación se procedió con la secuenciación del gen 16S rDNA según se describe en el Capítulo V.

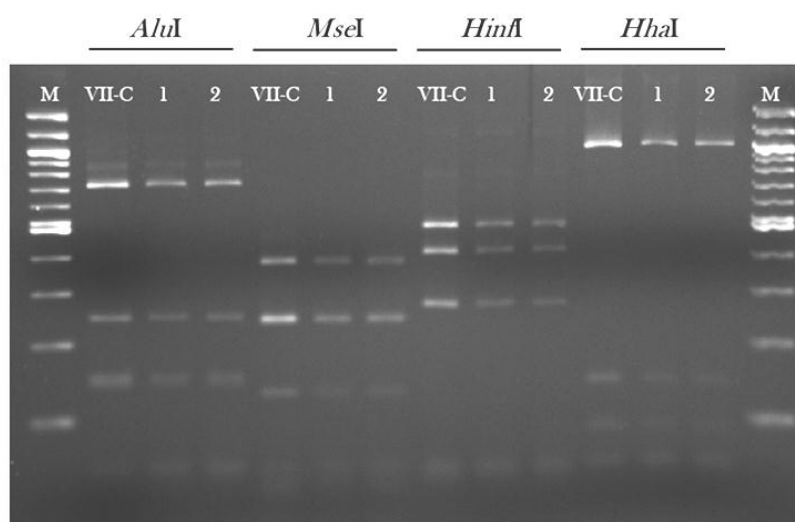


Figura 2.9: Patrones RFLP del producto de amplificación con los *primers* R16F2n/R16R2 del aislamiento EL-BV3 (2) y los fitoplasmas ArAWB (16SrVIIC) y ASP (VII-C) (1) con las enzimas *AluI*, *MseI*, *HinfI* y *HhaI*. M= marcador de peso molecular 100pb DNA ladder (NEB).

3.6 Análisis de la incidencia y prevalencia de la enfermedad *EL* en lotes productivos de Lules

3.6.1 Principales estadísticas de los muestreos

De manera visual se evaluaron 25000 plantas de las cuales 66 presentaron la sintomatología típica de *EL* (0.264%) y solo 6 de estas (9.09%) resultaron positivas para fitoplasmas al ser evaluadas mediante PCR. En cuanto a la Incidencia de la enfermedad los valores registrados fueron bajos, siendo estos de 0,004%, 0,004% y 0,001% para las campañas 2010, 2011 y 2012, respectivamente. Por su parte los valores de Prevalencia de la enfermedad fueron de 40, 56 y 25% para los años 2010, 2011 y 2012, respectivamente. Los principales estadísticos se resumen en la tabla 2.6.

Tabla 2.6: Principales estadísticas obtenidas en los muestreos de la región productiva de Lules durante las campañas 2010, 2011 y 2012. n°L: número de lotes registrados; sup.: superficie aproximada total muestreada; N°: número total de plantas inspeccionadas visualmente; n°EL: número total de plantas con sintomatología EL, n° EL PCR (+): número de plantas EL positivas para fitoplasmas mediante PCR; IEL: Incidencia enrojecimiento letal, PEL: prevalencia enrojecimiento letal, P(+): proporción de plantas EL PCR positivas y IF: incidencia fitoplasmas.

| Año | n° L | sup. | N° | n° EL | n° EL PCR (+) | IEL | PEL | P(+) | IF |
|--------------|-----------|---------------|--------------|-----------|---------------|------|--------|--------|---------|
| 2010 | 10 | 30 ha. | 3500 | 14 | 3 | 4e-3 | 40% | 21.42% | 8.57e-4 |
| 2011 | 27 | 31 ha. | 10900 | 39 | 2 | 4e-3 | 55.56% | 5.13% | 1.83e-4 |
| 2012 | 24 | 35 ha. | 10600 | 13 | 1 | 1e-3 | 25% | 7.69% | 9.43e-5 |
| total | 61 | 96 ha. | 25000 | 66 | 6 | - | - | - | - |

3.6.2 Relación entre la Incidencia y los cultivares y orígenes

El valor de Chi-cuadrado (Pearson) estimado fue de 30.44 ($p < 0.001$, $gl=6$), por lo que se rechaza la h_0 de igualdad de proporciones entre las distintas variedades, es decir que dependiendo del cultivar existen diferencias estadísticamente significativas en la proporción de plantas *EL*.

Tabla 2.7: Frecuencia de plantas *EL* y *noEL* (asintomáticas) para cada una de los cultivares analizados (campañas 2010, 2011 y 2012).

| Cultivares | EL | noEL | Total |
|-----------------------|-----------|--------------|--------------|
| Albian | 3 | 1647 | 1650 |
| Camarosa | 44 | 7806 | 7850 |
| Camarosa superpremium | 8 | 2742 | 2750 |
| Camino Real | 3 | 4747 | 4750 |
| Festival | 3 | 1697 | 1700 |
| Fortuna | 3 | 1297 | 1300 |
| San Andreas | 2 | 1798 | 1800 |
| Total | 66 | 21734 | 21800 |

Una vez determinado entonces que existen diferencias significativas en la proporción de plantas *EL* y plantas *noEL* respecto a los cultivares, se procedió con el cálculo de los odd ratios (Θ) para determinar cuáles de estos cultivares presentan mayores chances de presentar la enfermedad (tabla 2.8). En el cálculo de los odd rations se trabaja de a dos cultivares (en este caso) por vez y se genera un cociente entre ellos (por ej: chance de tener plantas *EL* del cultivar A/ chances de tener plantas *EL* del cultivar B). El valor resultante de dicho cociente puede ser $\Theta > 1$ si el cultivar A tiene mayores chances de presentar plantas que el cultivar B, $\Theta = 1$ si tienen las mismas chances, o $\Theta < 1$ si el cultivar B es el que tiene mayores chances. A su vez, para que el valor de Θ tenga validez primero deberá tener un límite superior (LS 95%) y un límite inferior (LI 95%), es decir un intervalo de confianza que no contemple el valor 1. En segundo lugar el valor de probabilidad asociado (p) deberá ser menor a 0,05. Teniendo en cuenta todo esto se determinó que de los cultivares analizados, Camarosa es el que mayor chance con significancia estadística tiene de presentar plantas enfermas. Respecto al cultivar Albion, Camarosa presenta 3,125 veces más chances ($p=0,0463$), respecto al cultivar Camino Real presenta 8,92 veces más chances ($p < 0,0001$), con el cultivar Festival 3.19 más chances ($p= 0,042$) y por último con el cultivar San Andreas unas 5.07 veces más

chances ($p=0,0125$) de presentar plantas *EL*. No se observaron valores de odd ratios con significancia estadística cuando se comparó Camarosa respecto de los cultivares Fortuna y Camarosa superpremium. Por otro lado, el cultivar Camarosa superpremium presentó 4,62 veces más chances respecto del cultivar Camino Real ($p=0,0130$). Para el resto de las comparaciones no se obtuvieron valores con significancia estadística.

Tabla 2.8: Valores de proporción entre chances de cada cultivar de presentar plantas con sintomatología EL. Θ : proporción (odd ratio) entre cultivares estimado; LI: Límite inferior del intervalo de confianza para el valor Θ ($\alpha=0.05$), LS: Límite superior del intervalo de confianza para el valor Θ ($\alpha=0.05$); p: valor de probabilidad asociado. En gris los valores de odd ratio con significancia estadística (*).

| Comparaciones | Θ | LI (95%) | LS (95%) | p |
|------------------------------|----------|----------|----------|------------|
| Albion vs Camarosa | 0,32 | 0,11 | 0,96 | 0,0463 * |
| Albion vs Camarosa sup. | 0,62 | 0,18 | 2,17 | 0,483 |
| Albion vs Camino Real | 2,88 | 0,65 | 12,7 | 0,1748 |
| Albion vs Festival | 1,03 | 0,23 | 4,54 | 0,9708 |
| Albion vs Fortuna | 1,27 | 0,18 | 3,47 | 0,7695 |
| Albion vs San Andreas | 1,64 | 0,32 | 8,31 | 0,5855 |
| Camarosa vs Camarosa sup. | 1,93 | 0,93 | 4,03 | 0,0816 |
| Camarosa vs Camino Real | 8,92 | 3 | 26,49 | < 0,0001 * |
| Camarosa vs Festival | 3,19 | 1,07 | 9,48 | 0,0402 * |
| Camarosa vs Fortuna | 2,44 | 0,82 | 7,25 | 0,1235 |
| Camarosa vs San Andreas | 5,07 | 1,42 | 18,13 | 0,0125 * |
| Camarosa sup. Vs Camino Real | 4,62 | 1,33 | 16,04 | 0,0130 * |
| Camarosa sup. Vs Festival | 1,65 | 0,47 | 5,74 | 0,4551 |
| Camarosa sup. Vs Fortuna | 1,26 | 0,26 | 4,39 | 0,7314 |
| Camarosa sup. Vs Fortuna | 2,62 | 0,64 | 10,76 | 0,2054 |
| Camino real vs Festival | 0,36 | 0,08 | 1,57 | 0,1885 |
| Camino real vs Fortuna | 0,27 | 0,06 | 1,2 | 0,0889 |
| Camino real vs San Andreas | 0,57 | 0,11 | 2,88 | 0,5305 |
| Festival vs Fortuna | 0,76 | 0,17 | 3,37 | 0,7415 |
| Festival vs San Andreas | 1,59 | 0,31 | 8,07 | 0,6089 |
| Fortuna vs San Andreas | 2,08 | 0,41 | 10,56 | 0,4126 |

En relación a los distintos orígenes se establecieron también las frecuencias de cada uno de ellos respecto al número de plantas *EL* (nEL) y número de plantas asintomáticas (noEL) (tabla 2.9). El valor de Chi-cuadrado (Pearson) estimado fue de 31.11 ($p<0,001$, $gl=6$) por lo que se rechaza la H_0 de igualdad de proporciones de plantas EL entre los distintos orígenes.

Tabla 2.9: Frecuencia de plantas *EL* y *noEL* (asintomáticas) para cada una de los viveros analizados (campañas 2010, 2011 y 2012).

| Origen | EL | noEL | Total |
|---------------------|-----------|--------------|--------------|
| Vivero Don Antonio | 21 | 3479 | 1650 |
| Vivero La Loma | 4 | 4796 | 7850 |
| Vivero M. Fernandez | 7 | 2243 | 2750 |
| Vivero N. del Sel | 16 | 5684 | 4750 |
| Vivero Patagonia | 11 | 2089 | 1700 |
| Vivero Vallejo | 4 | 3996 | 1300 |
| Vivero Viansa | 3 | 2397 | 1800 |
| Total | 66 | 24684 | 24750 |

Comparando los distintos orígenes, se observa que el vivero Don Antonio presenta 7,24 veces más chances de tener plantas *EL* respecto del vivero La Loma ($p < 0,0001$), 2,14 veces más chances respecto del vivero N. del Sel ($p = 0,0188$), 6,03 veces más chances respecto del vivero Vallejo ($p = 0,0002$), y por último 4.82 veces más chances respecto del vivero Viansa ($p = 0,049$). El vivero Don Antonio es entonces aquel que mayores chances de presentar plantas *EL* tiene, ya que de las 6 comparaciones posibles, siempre ha tenido más chances que el resto de los orígenes (valores de $\Theta > 1$) y con diferencias estadísticamente significativas en 4 de estas comparaciones. Por otro lado, el vivero La Loma es el que en proporción menor chances de presentar plantas *EL* tiene (valores de $\Theta < 1$), encontrándose diferencias significativas respecto a los viveros M. Fernandez ($p = 0,0239$), N. del Sel ($p = 0,0209$) y Patagonia ($p = 0,0003$) con odd ratios estimados de 0,27; 0,1 y 0,05 respectivamente. El vivero Patagonia es también otro de los que mayores chances de presentar plantas *EL* tiene, con valores de $\Theta < 1$ en casi todas las comparaciones (menos con Vivero Don Antonio), pero solo se ha encontrado significancia estadística cuando fue comparado con las variedades Vallejo y Viansa, con valores de Θ de 5,26 y 4,21 y valores de p asociados de 0,0015 y 0,0165 respectivamente.

Tabla 2.10: Valores de proporción entre chances de cada vivero de presentar plantas con sintomatología EL. Θ : proporción (odd ratio) entre cultivares estimado; LI: Límite inferior del intervalo de confianza para el valor Θ ($\alpha=0.05$), LS: Límite superior del intervalo de confianza para el valor Θ ($\alpha=0.05$); p: valor de probabilidad asociado. En gris los valores de odd ratio con significancia estadística (*).

| Comparaciones | Θ | LI (95%) | LS (95%) | p |
|-----------------------------|----------|----------|----------|------------|
| Don Antonio vs La Loma | 7,24 | 2,62 | 20,01 | < 0,0001 * |
| Don Antonio vs M. Fernandez | 1,93 | 0,84 | 4,45 | 0,1246 |
| Don Antonio vs N. del Sel | 2,14 | 1,13 | 4,08 | 0,0188 * |
| Don Antonio vs Patagonia | 1,15 | 0,56 | 2,35 | 0,7142 |
| Don Antonio vs Vallejo | 6,03 | 2,18 | 16,67 | 0,0002 * |
| Don Antonio vs Vianza | 4,82 | 1,56 | 14,94 | 0,049 * |
| La Loma vs M. Fernandez | 0,27 | 0,08 | 0,86 | 0,0239 * |
| La Loma vs N. del Sel | 0,3 | 0,1 | 0,84 | 0,0209 * |
| La Loma vs Patagonia | 0,16 | 0,05 | 0,47 | 0,0003 * |
| La Loma vs Vianza | 0,83 | 0,23 | 3,08 | 0,7962 |
| La Loma vs Vallejo | 0,67 | 0,16 | 2,7 | 0,5928 |
| M. Fernandez vs N. del Sel | 1,11 | 0,47 | 2,63 | 0,8201 |
| M. Fernandez vs Patagonia | 0,59 | 0,24 | 1,49 | 0,2748 |
| M. Fernandez vs Vallejo | 3,12 | 0,97 | 10,04 | 0,056 |
| M. Fernandez vs Vianza | 2,49 | 0,7 | 8,88 | 0,171 |
| N. del Sel vs Patagonia | 0,53 | 0,23 | 1,14 | 0,1049 |
| N. del Sel vs Vallejo | 2,81 | 0,99 | 7,98 | 0,0534 |
| N. del Sel vs Vianza | 2,25 | 0,71 | 7,13 | 0,1859 |
| Patagonia vs Vallejo | 5,26 | 1,77 | 15,66 | 0,0015 * |
| Patagonia vs Vianza | 4,21 | 1,27 | 13,94 | 0,0165 * |
| Vallejo vs Vianza | 0,8 | 0,2 | 3,24 | 0,7696 |

3.6.3 Relación entre la Prevalencia de la enfermedad EL y el cultivar y origen

Se analizó también la proporción entre la cantidad de lotes con al menos 1 planta con sintomatología EL/lotes sin plantas EL para aquellos cultivares y viveros que hayan presentado al menos 1 lote con plantas EL. Para el caso de los cultivares (tabla 2.11) no se observaron diferencias significativas (Chi cuadrado pearson= 6,41; p=0,2685) entre ninguno de ellos respecto a la proporción de lotes con al menos 1 planta EL. Dado esto no se rechaza la h_0 de igualdad de proporciones y se establece que no hay influencia de los cultivares en la proporción de lotes con al menos 1 planta EL. Por otro lado, cuando se analizaron los distintos viveros (tabla 2.12), no se observaron diferencias significativas (Chi cuadrado pearson= 11,04, p=0,0871), por lo que no existe evidencia suficiente para rechazar la h_0 de igualdad de proporciones y se establece que no hay diferencias entre los distintos viveros en cuanto a la cantidad de lotes con plantas EL.

Tabla 2.11: Frecuencia de plantas lotes con plantas *EL* y *noEL* (asintomáticas) para cada una de los cultivares analizados (campañas 2010, 2011 y 2012).

| Cultivar | n° Lotes con EL | n° Lotes sin EL | Total |
|-----------------------|------------------------|------------------------|--------------|
| Albion | 1 | 3 | 4 |
| Camarosa | 9 | 2 | 11 |
| Camarosa superpremium | 4 | 2 | 6 |
| Camino Real | 3 | 6 | 9 |
| Festival | 2 | 1 | 3 |
| Fortuna | 2 | 1 | 3 |
| San Andreas | 1 | 2 | 3 |
| Total | 22 | 17 | 39 |

Tabla 2.12: Frecuencia de lotes con plantas *EL* y *noEL* (asintomáticas) para cada uno de los viveros analizados (campañas 2010, 2011 y 2012).

| Vivero | n° Lotes con EL | n° Lotes sin EL | Total |
|---------------------|------------------------|------------------------|--------------|
| Vivero Don Antonio | 6 | 2 | 8 |
| Vivero La Loma | 2 | 6 | 8 |
| Vivero M. Fernandez | 3 | 0 | 3 |
| Vivero N. del Sel | 4 | 7 | 11 |
| Vivero Patagonia | 2 | 3 | 5 |
| Vivero Vallejo | 2 | 8 | 10 |
| Vivero Vianza | 2 | 4 | 6 |
| Total | 21 | 30 | 51 |

3.6.4 Relación entre la proporción de plantas infectadas con fitoplasmas y presencia del síntoma

Se evaluaron mediante PCR anidado un total de 182 plantas de frutilla, de las cuales 50 eran asintomáticas, y 132 presentaban sintomatología *EL* (66 correspondientes al muestreo propiamente dicho y 66 obtenidas fuera del muestreo). En ninguna de las 50 muestras *noEL* analizadas se obtuvieron reacciones de PCR anidado positivas para fitoplasmas. Dentro de las muestras con sintomatología *EL* 6 muestras que resultaron positivas por PCR de las 66 analizadas correspondientes al muestreo propiamente dicho como fue desarrollado en el punto 3.6.1., mientras que 11 de las 66 muestras obtenidas fuera del muestreo resultaron PCR anidado positivas, por lo que solo 17 de 132 muestras analizadas con sintomatología *EL* resultaron positivas por PCR anidado. El análisis estadístico llevado a cabo mediante tablas de contingencia determinó que hay evidencias para rechazar la h_0 de igualdad de proporciones entre las muestras sintomáticas y asintomáticas respecto a la cantidad de plantas PCR anidado positivas para fitoplasmas (Chi cuadrado 7.10, $p=0.0077$). De este modo se puede decir que existe

relación entre la sintomatología y la proporción de plantas PCR anidado positivas para fitoplasmas.

Tabla 2.13: Frecuencia de plantas con síntoma EL y plantas asintomáticas noEL, y la presencia de fitoplasmas PCRn(+): muestras positivas mediante PCR nested, PCR(-) muestras negativas mediante PCR

| Síntoma | PCRn (+) | PCRn (-) | Total |
|----------------|-----------------|-----------------|--------------|
| Plantas EL | 17 | 115 | 132 |
| Plantas noEL | 0 | 50 | 50 |
| Total | 17 | 165 | 182 |

4. Discusión

En el presente capítulo se logró determinar la presencia de fitoplasmas asociados a la enfermedad de *Enrojecimiento Letal* (EL) de la frutilla en lotes productivos de Argentina. El primer desafío enfrentado fue ajustar los procedimientos de extracción en especies tan recalcitrantes como la frutilla para la generación de un sistema de diagnóstico rápido, eficiente y específico. En frutilla, al igual que en otros *berries*, la presencia de metabolitos secundarios tales como polifenoles, taninos y polisacáridos inhiben la reacción de la enzima taq-polimerasa en las reacciones de PCR (Porebski et al., 1997), por lo tanto se ensayaron diversos protocolos de extracción de ADN con el fin de disminuir el impacto de dichos compuestos en las reacciones de amplificación. De las 3 modificaciones respecto del protocolo estándar (CTAB común) (Doyle and Doyle, 1990) utilizado para la extracción, la menor proporción de ADN con capacidad de inhibición fue obtenida en aquella en la que se empleó PVPP y doble lavado con cloroformo: isoamílico (24:1). El PVPP tiene capacidad de unirse a los polifenoles por lo que colabora en la remoción de los mismos en las extracciones de ADN (Porebski et al., 1997, Barra et al, 2012). Por otro lado, de los 3 tejidos evaluados para realizar la extracción, se comprobó que el peciolo-nervadura central de las hojas es el que menor proporción de inhibición presenta y por ello el que fue empleado en las extracciones. Esto puede deberse ya que se ha demostrado que en la lamina de las hojas de frutilla la concentración de taninos, polifenoles y polisacaridos aumenta (Porebski et al., 1997, Nunes et al., 2011). De esta manera se consiguieron establecer las condiciones óptimas para la obtención de ADN de frutilla reduciendo significativamente la presencia de compuestos inhibidores.

Posteriormente se extrajo el ADN a partir de las muestras de frutillas con sintomatología de *EL* recolectadas en Bella Vista (Corrientes) y Lules (Tucumán). El análisis de los patrones PCR-RFLP del gen 16S rDNA reveló la presencia de al menos 3 grupos de fitoplasmas asociados a la misma (grupos 16SrXIII, III y VII). Para el caso de los aislamientos EL-BV-1 y EL-BV-2 (Bella Vista), los patrones RFLP resultaron idénticos a los de los aislamientos ELTc-1 y ELTc-7 previamente descritos afectando frutilla en Lules (Fernández et al., 2008a, b) y de los cuales se creen conformarían un nuevo subgrupo aún no descrito dentro del grupo 16SrXIII. En la actualidad se ha demostrado que tanto los aislamientos EL-Tc1, EL-Tc7 como los aislamientos EL-BV1 y EL-BV2, son aislamientos geográficos de un mismo fitoplasma, el *Strawberry Red Leaf* (StrawRL) y que juntos conforman un nuevo subgrupo descrito por primera vez en el mundo, 16SrXIII-F (Fernández et al., 2015). Los análisis a nivel de la secuencia del gen 16S rDNA que permitieron completar esta clasificación se desarrollan con mayor detalle en el Capítulo V. Por su parte los aislamientos EL-Tc2, EL-Tc3 y EL-Tc4 (Lules) presentaron patrones RFLP que los relacionan con el de los fitoplasmas de subgrupos 16SrIII-B. El subgrupo 16SrIII-B es conjuntamente con el subgrupo 16SrIII-J, el más frecuente y distribuido en nuestro país, habiéndose registrado su presencia en paraíso (*Melia azederach*), tomate (*Solanum lycopersicum*), lagaña de perro (*Caesalpinia gilliesii*) y vinca (*Catharanthus roseus*) entre otros (Galdeano et al., 2004, 2013). En Tucumán, se ha registrado la presencia del subgrupo 16SrIII-B tanto en paraíso como en tomate (Galdeano et al., 2013), por lo que es posible suponer que las plantas de frutilla hayan sido infectadas a campo mediante insectos vectores presentes en el mismo.

El aislamiento EL-BV3 presentó patrones RFLP idénticos al de los fitoplasmas ArAWB y ASP, ambos del subgrupo 16SrVII-C, el cual es un grupo 16Sr descrito exclusivamente en el cono sur americano, y que ha sido detectado en alfalfa (Conci et al., 2005) y en frutilla (Fernández et al., 2013b) ocasionando escoba de bruja y filodia, respectivamente. Estos resultados demuestran que la sintomatología denominada *Enrojecimiento Letal* de la frutilla en Argentina está asociada a la presencia de más de un fitoplasma. En frutilla ya se ha reportado la etiología diversa causando enfermedades, demostrándose la presencia de múltiples fitoplasmas (Harrison et al.,

1997, Jomantiene et al., 1998, 2001, Fernández et al., 2013b). Esta situación también se ha presentado en la enfermedad conocida como *enanismo del broccoli* (broccoli stunt) la cual ha sido reportada en Brasil y en la que se han logrado identificar tres fitoplasmas distintos (Eckstein et al., 2014). En Serbia, el amarillamiento de la vid (grapevine yellows) se lo ha podido asociar a la presencia de al menos 3 fitoplasmas distintos (Duduk et al., 2004), mientras que en Italia múltiples fitoplasmas han sido detectados en relación el declinamiento en diversos frutales (Lee et al., 1995). Para cada fitoplasma el rango de plantas hospedantes está determinado en gran parte por el número de especies de insectos vectores en cada región y por el comportamiento alimenticio de los mismos (mono-, oligo o polífagos) (Lee et al., 1998b). De manera experimental, algunos fitoplasmas pueden ser transmitidos por un vector polífago a un gran rango de hospedantes (Golino et al., 1989, McCoy et al., 1989, Weintraub y Beanland, 2006). Tal es el caso de los fitoplasmas American aster yellows (16SrI-A, -B), los cuales son transmitidos por el vector polífago *Macrostelus fascifrons* (Familia Cicadellidae) a 191 especies de plantas pertenecientes a 42 familias (Golino et al., 1989). Por otro lado, cada especie de planta tiene la potencialidad de albergar más de un tipo de fitoplasma. La planta de vinca (*Catharanthus roseus*), comúnmente usada como reservorio experimental de fitoplasmas, tiene la capacidad de albergar la mayoría de los fitoplasmas conocidos (Lee et al., 1998b). Sin embargo, en la naturaleza la capacidad de una especie vegetal dada de albergar uno o más tipos de fitoplasmas no es completamente dependiente de la susceptibilidad de la planta a la infección por fitoplasmas, sino más bien del rol que cumple el insecto vector. La distribución geográfica de los insectos vectores y sus preferencias alimentarias son los dos factores más importantes que determinan cuando una especie dada de planta será infectada por un solo o múltiples fitoplasmas (Lee et al., 1998b). En el caso particular de la frutilla, resulta conocido que es un hospedante excepcional puesto que tiene la capacidad de albergar diversos grupos de fitoplasmas. Se han descrito al menos 6 grupos 16Sr de fitoplasmas (16SrI, 16SrIII, 16SrVI, 16SrVII, 16SrXII y 16SrXIII) afectando a la frutilla en distintas partes del mundo (Harrison et al., 1997; Jomantiene et al., 1998, 1999, 2001; Padovan et al., 2000; Fernández et al., 2013b; 2015). En el presente capítulo se han descrito fitoplasmas de al menos 3 grupos 16Sr (16SrIII, 16SrVII y 16SrXIII) asociados a la enfermedad del Enrojecimiento letal de la frutilla. Estos

resultados estarían refutando nuestra hipótesis, ya que el fitoplasmas StrawRL no sería el único agente etiológico asociado a la enfermedad *EL*.

Por otro lado, para demostrar la correcta identidad de cada uno de los fitoplasmas asociados a *EL* es necesario contar con la secuencia de al menos el gen 16S rDNA, evaluar los patrones RFLP *in silico* y las relaciones filogenéticas. El análisis de la secuencia del gen 16S rDNA de estos y otros fitoplasmas se desarrolla extensivamente en el capítulo V, y se completa así la clasificación, además de establecer si se trata de patógenos ya presentes en la región o de otras áreas productoras. Si bien en el presente capítulo no se profundiza sobre el análisis filogenético de los fitoplasmas identificados que son fundamentales para comprobar diferentes hipótesis, con los datos aquí generados se puede plantear o bien que las plantas de frutilla son infectadas por vectores *in situ* o hipotetizar que los aislamientos descritos presentan mayor relación con otros identificados en otras regiones y así demostrar que el mecanismo de dispersión estaría relacionado con la importación de plantas madres infectadas desde el exterior. En función de los resultados obtenidos en el Capítulo 4 podremos acercarnos a la hipótesis correcta.

Por otro lado, durante los años 2010, 2011 y 2012 en lotes productivos de la región de Lules (Tucumán) se realizaron muestreos sistemáticos con el fin de establecer las relaciones existentes entre los distintos cultivares implantados y el origen (viveros) de los mismos con la proporción de plantas con *Enrojecimiento Letal* y la proporción de lotes afectados por la misma. Se estableció la relación existente entre la presencia de la enfermedad y la presencia de fitoplasmas. Aunque hay que destacar que solo el 12.08% de las muestras *EL* resultaron infectadas con fitoplasmas, por lo que se presume que dicha sintomatología estaría ocasionada no solamente por la presencia de fitoplasmas sino además podrían estar implicados otros factores bióticos y abióticos, que no han sido registrados en este análisis. Esta clase de análisis resulta de vital importancia para la toma de decisiones en el manejo de esta clase de enfermedades, puesto que determinar que cultivares se ven más o menos afectados permiten elegir cuales son los genotipos con los que se debería trabajar, o bien determinar si existen determinados orígenes (viveros) cuyos plantines tienen mayor proporción de plantas enfermas y con

ello mejorar las practicas realizadas en cada una de ellos o los controles en el proceso de importación del material.

Los resultados demostraron que existe relación entre la proporción de plantas con sintomatología *EL* y el cultivar implantado, así como también con el origen (vivero) de los plantines. Se ha demostrado que para el caso de la frutilla existen cultivares que se comportan de manera diferencial a la presencia de un mismo fitoplasma. Estudios realizados en otras regiones productoras han demostrado que de 6 cultivares de *Fragaria chiloensis* ensayados algunos mostraron una alta susceptibilidad (Cultivares: Sparkle, Redcoat, y Redchief) al fitoplasma *Clover phydolly*, mientras que otros demostraron tener una resistencia relativa a la enfermedad (Cultivares: Kentville, Nova Scotia y Vibrant) (Chiukowski y Craig, 1975). Otros estudios han demostrado que Camarosa es el cultivar mas susceptible a la infección causada por los patógenos *Fusarium oxysporum* y *Macrophomina phaseolina* cuando fue comparado su rendimiento respecto de los cultivares Albion, Aromas, Camino Real, Festival, Gaviota y Selva (Fang et al., 2012). Este mismo estudio ha demostrado tambien que el Cultivar Camino Real es el que mayor resistencia presento a los patógenos ensayados y como consecuencia de ello mayor rendimiento (tanto a campo como experimentalmente) ha logrado. En nuestro caso el cv. Camarosa es el que ha mostrado ser siempre el que mayor proporción de plantas con *EL* presenta, ya que los valores de *odd ratio* (chances de presentar plantas con *EL* respecto de otro cultivar) siempre fueron mayores a uno. Caso contrario para el cv. Camino Real, puesto que los valores de *odd ratio* siempre fueron menor a 1. Si bien se tratan de patógenos distintos, se demuestra la importancia de estudiar el comportamiento de distintos cultivares frente a las distintas enfermedades. Esto permite la identificación de resistencia antes de el desarrollo o implementación de nuevos cultivares, con el fin de eliminar o reducción la propagación de los patógenos sobre todo en los viveros (Mackenzie et al., 2006).

En este trabajo se demuestra que el síntoma de *EL* tiene diversas causas, y que solo una pequeña porción puede ser explicada por la presencia de fitoplasmas en plantas sintomáticas. La baja incidencia y la relativamente alta prevalencia de la presencia de fitoplasmas, podrían indicar que las infecciones son producidas localmente por insectos probablemente escasos, con baja eficiencia de transmisión o que no prefieren a la

frutilla para su alimentación. Otro aspecto a considerar, es la evaluación de patógenos sistémicos en las plantas madres de los pocos viveros que las multiplican y que proveen a todas las áreas productoras del país e incluso el exterior. La posibilidad de implantar material asintomático infectado bajo condiciones climáticas predisponentes o poblaciones de insectos diferentes, podrían modificar los parámetros de dispersión de estos patógenos, con las consecuencias epidemiológicas que podría traer aparejado.

Capítulo III

Caracterización epidemiológica del fitoplasma *China tree yellows* (16SrXIII-C): Análisis de su distribución en Argentina

1. Introducción

El árbol de paraíso (*Melia azedarach* L., familia Meliaceae) es una especie nativa del sudeste asiático introducida hacia finales del siglo XIX en Sudamérica con fines tanto ornamentales como forestales. En nuestro país crecen dos variedades del paraíso: i) var. *gigantea*, la cual es utilizada como fuente de madera para la fabricación de muebles y laminados, y ii) var. *Umbraculifera* empleada en el arbolado público y como ornamental (Galdeano et al., 2004). La importancia forestal del paraíso radica en la calidad de su madera, semejante a la de los cedros de la flora nativa de Misiones y a su corto turno de aprovechamiento, obteniéndose a los 12 a 14 años material con aptitudes tecnológicas que lo hacen apto para su comercialización. Se cultiva en Buenos Aires, Mendoza, Salta, Jujuy, Santiago del Estero, Chaco, Formosa, Corrientes y Misiones. Su rápido crecimiento y rusticidad han justificado su utilización, entre las que se cuentan la elaboración de terciados, muebles, escritorios, machimbres, trabajos de ebanistería, puertas, ventanas, etc (Agostini et al., 2005). Además del aprovechamiento de su madera, esta especie se caracteriza también por poseer numerosos compuestos con propiedades farmacológicas muy diversas (antiulceroso, antibacteriano, hepatoprotector, antioxidante, anti-fertilidad, antihelmíntico, antipirético, actividades anti-parasitarias, citotóxicos entre otros) (Rupa et al., 2014). A pesar de todas estas características favorables, esta especie se utiliza cada vez con menor frecuencia en programas forestales. Esta disminución en la superficie cultivada, es en gran parte debida a la ocurrencia de una enfermedad producida por un fitoplasma conocida como *declinamiento o amarillamiento del paraíso* (Vazques et al., 1983). La sintomatología característica de dicha enfermedad comienza con amarillamiento internerval en las hojas y totalizando luego toda la lámina foliar. Con el tiempo, se van haciendo visibles ramas amarillentas aisladas que contrastan con el color verde del resto del follaje. En las mismas ramas se presenta un acortamiento de entrenudos, hojas amarillentas, acartuchadas, notablemente más pequeñas que las normales. Las ramas afectadas culminan secándose, mientras que el resto de árbol conserva un aspecto sano (Figura 3.1). Progresivamente, esta secuencia de síntomas se sucede en el resto de las ramas acarreado la muerte del árbol en el transcurso de 2-3 años. Vazquez y col. (1983) fueron los primeros en reportar la presencia de un fitoplasma (en aquel momento denominado organismo similar a mycoplasma, MLO) en Argentina mediante

microscopía electrónica, serología y reversión de síntomas aplicando inyecciones de doxitettraciclina. Con un enfoque metodológico similar, se registró luego, la presencia de fitoplasmas en países limítrofes como Paraguay (Matsuoka et al., 1986) y Brasil (Muñoz et al., 1987). La presencia de fitoplasmas asociada a la enfermedad de *declinamiento de paraíso* fue posteriormente comprobada mediante PCR empleando cebadores universales (Gomez et al., 1996) aunque la identidad del mismo permanecía sin resolverse.



Figura 3.1: Ejemplares de paraíso mostrando la típica sintomatología de declinamiento. A: planta sintomática (izq.) vs planta asintomática (der.), B: planta de paraíso mostrando distintos síntomas como amarillamiento, acortamiento de entrenudos y pérdida de hojas. Se visualiza también en la misma planta porciones con ausencia total de síntomas, C, D y F: diferentes grados de amarillamiento

La generación de un antisuero policlonal a partir de extractos vegetales provenientes de paraísos con sintomatología de declinamiento (Gomez et al., 1996) permitió demostrar la presencia de fitoplasmas en otras especies tales como el Cedro rojo Australiano (*Toona ciliata*, familia Meliaceae) o en plantas de ajo (*Allium sativum* L.) asociados con la enfermedad conocida como *tristeza del ajo*, presente en todas las regiones productoras de ajo en Argentina (Conci et al., 1998). La caracterización

mediante PCR-RFLP del fitoplasma asociado a la tristeza del ajo y del fitoplasma asociado al decaimiento del paraíso fueron relacionados con el grupo X-disease (16SrIII) (Conci et al., 1998). Más adelante Harrison y col. (2003) determinaron la existencia de dos fitoplasmas asociados a la presencia de amarillamiento y disminución del tamaño foliar acompañado por muerte progresiva en árboles de paraíso en Bolivia. En dicho trabajo, el análisis de los patrones PCR-RFLP del gen 16S rDNA, determinó que uno de estos fitoplasmas pertenece al grupo 16SrIII, subgrupo-J, sin embargo nuevos análisis han determinado que en realidad se trata del subgrupo 16SrIII-B (Pérez-López et al., 2015). Por su parte el otro fitoplasma fue clasificado como miembro del grupo 16SrXIII subgrupo 16SrXIII-C, siendo ese el primer reporte de un fitoplasma del grupo 16SrXIII presente en Sudamérica. En Argentina, Galdeano y col. (2004) realizaron la caracterización molecular del fitoplasma asociado al declinamiento del paraíso. En este trabajo, sustentado por el análisis de los patrones PCR-RFLP del gen 16S rDNA y el análisis filogenético de la misma secuencia, se concluye que dicho patógeno, al cual se lo denominó *China tree decline* (ChTDIII), pertenece al grupo 16SrIII, subgrupo-B al igual que el descrito por Harrison y col. (2003) (reclasificación propuesta por Pérez-López et al., 2015). Posteriormente se registró la presencia de otro fitoplasma, asociado a la sintomatología de declinamiento y amarillamiento del paraíso, principalmente en la región del nordeste y Tucumán en Paraguay y Argentina (Arneodo et al., 2005; 2007, respectivamente). El análisis de los patrones PCR-RFLP y secuencia del gen 16S rDNA, así como la amplificación mediante cebadores específicos, determinó que dicho fitoplasma pertenece al grupo/subgrupo 16SrXIII-C (Arneodo et al., 2005; 2007), al igual que el fitoplasma previamente caracterizado por Harrison y col. (2003). El fitoplasma caracterizado recibió el nombre de *China tree yellows* (ChTYXIII) y constituyó así la primera cita del grupo 16SrXIII en Argentina (Arneodo et al., 2007). Este último trabajo demuestra además, que existen diferencias en la distribución de los fitoplasmas ChTYXIII y ChTDIII dentro de la Argentina. La presencia de infecciones mixtas fue demostrada mediante la amplificación por PCR empleando primers específicos de los grupos 16SrIII y 16SrXIII (Arneodo et al., 2007). La sintomatología ocasionada por ambos fitoplasmas es indistinguible, y no se ha observado cambios en el patrón de la misma en infecciones mixtas (Harrison et al., 2003; Arneodo et al., 2007). Si se tiene en cuenta las zonas en donde la presencia de

infecciones mixtas se ha registrado, el fitoplasmas mas prevalente es el ChTYXIII (16SrXIII-C) (Arneodo et al., 2007).

El fitoplasma ChTDIII (16SrIII-B) cuenta con una amplia distribcion a lo largo de todo el territorio Argentino (Arneodo et al., 2007), abarcando tambien otros países como Bolivia (Harrison et al., 2003), Paraguay (Arneodo et alk., 2005) y Brasil (Duarte et al., 2009). Esta amplia distribución resulta acorde si se tiene en cuenta la gran variedad de especies vegetales en donde se ha reportado dicho subgrupo (Pérez-López et al., 2015), asi como tambien la presencia de potenciales vectores en la región (Eckstein et al., 2014).

Por su parte, el fitoplasmas ChTYXIII (16SrXIII-C), objeto de estudio en esta tesis, tiene una distribucion que comprende las provincias del noroeste Argentino (Misiones, Corrientes, Chaco, y Formosa) con algunas detecciones esporádicas en infecciones mixtas en Tucuman (Arneodo et al., 2007). La incidencia de este fitoplasmas notablemente mayor en Misiones (Arneodo et al., 2007), la cual constituye en la actualidad la provincia de mayor producción de madera (5 millones de tn) de nuestro país (Sector Forestal- Ministerio de Agricultura, Ganaderia y Pesca, 2013). Esta provincia, contribuyo con una producción de 10.000 tn de producción de madera de paraíso para el año 2013 (Sector Forestal- Ministerio de Agricultura, Ganaderia y Pesca, 2013) siendo la única provincia con registros de produccion de esta especie. Si bien se desconocen las causas de la distribucion tan marcada del fitoplasmas ChTYXIII, se presume que su dispersión hacia otras zonas podría estar sujeta a la acción de insectos vectores o bien por las actividades humanas (Arneodo et al., 2007). En relación a esto ultimo, existe evidencia que indica que plantines de paraíso provenientes de la zona de Misiones, han sido transportados hacia otras zonas de nuestro país con fines forestales (Gaillard de Benitez et al., 2002). Si bien se cuenta con información acerca de la distribución de este patógeno, no se conoce con precisión los límites geográficos de la misma. Teniendo en cuenta que el hospedante (*Melia azedarach* L.) tiene una distribución continua, contar con esta información es relevante desde el punto de vista del conocimiento del patosistema, porque permitirá abordar nuevos estudios y relacionar dicha distribución con factores tales como la presencia de insectos vectores, transporte de ejemplares entre regiones, variables del tipo ambientales, entre otras.

Dado lo anteriormente expuesto se propone el siguiente objetivo específico:

Objetivo específico 2: Determinar la presencia e identidad de fitoplasmas asociados a la enfermedad *amarillamiento del paraíso* y estudiar la distribución geográfica del fitoplasma *China tree yellows*, el cual es uno de los agentes etiológicos asociado a la enfermedad amarillamiento del paraíso, en Argentina.

2. Materiales y Métodos

2.1 Recolección de muestras de paraíso (*Melia azedarach* L.) con sintomatología de declinamiento

Durante los meses de diciembre-enero y febrero, donde la expresión de los síntomas es mayor, de los años 2011-2012 y 2013, se recolectaron muestras de paraísos sintomáticos en 67 puntos de muestreo abarcando 10 provincias (Córdoba, Tucumán, Jujuy, Mendoza, Santa Fe, Corrientes, Entre Ríos, Chaco, Formosa y Misiones). Cada uno de los puntos de muestreo fueron georeferenciados (GPS, Garmin) con la finalidad de obtener un mapa detallado de la distribución de la enfermedad. Los ejemplares recolectados presentaban sintomatología típica de declinamiento, con presencia de amarillamiento en hojas ya sea en sectores parciales del árbol o en la totalidad del mismo, disminución del tamaño de las hojas, acortamiento de entrenudos y en algunos casos pérdida total o parcial de hojas. De cada árbol se recolectaron ramas y hojas sintomáticas, las cuales se conservaron en condiciones de humedad y temperatura adecuadas hasta su posterior procesamiento. En los muestreos también se recolectaron ramas y hojas asintomáticas para su empleo como control. Dado que el árbol de paraíso está asociado con zonas urbanas y periurbanas, los muestreos se realizaron o bien en el arbolado público o sobre ejemplares a la vera de la ruta, en cercanía a lugares poblados. A su vez se recolectaron muestras provenientes de localidades en donde no ha sido registrada la presencia del fitoplasma ChTYXIII (Arneodo et al., 2007) para determinar si su distribución se ha ido ampliando en el transcurso del tiempo.

2.2 Detección de fitoplasmas en muestras sintomáticas de paraíso mediante PCR del gen 16Sr DNA

Para la obtención de ADN, se procedió con el protocolo establecido por Doyle y Doyle (1990) sin modificaciones (detalles en Capítulo II, Materiales y métodos 2.5), dado que para el paraíso no hay registro de presencia de compuestos inhibidores de la polimerasa (Harrison et al., 2003, Galdeano et al., 2004, Arneodo et al., 2005,2007). Las extracciones se llevaron a cabo a partir de porciones de pecíolo y la nervadura central de hojas sintomáticas. Tanto la cantidad, como la calidad del ADN, se evaluaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%/TAE 1X, teñidos con bromuro de etidio y

visualizados bajo luz UV. La presencia de fitoplasmas fue evaluada mediante PCR directo empleando el juego de *primers* R16F2/R16R2 (Lee et al., 1993), los cuales amplifican un fragmento de 1.2kb del gen 16S rDNA, de acuerdo a lo establecido en el Capítulo II.

2.3 Identificación de los diferentes fitoplasmas mediante PCR-RFLP del gen 16S rDNA

Con la finalidad de poder diferenciar aquellas muestras infectadas con el fitoplasma *China tree yellows* (ChTYXIII, grupo 16SrXIII-C) de las afectadas con *China tree decline* (ChTDIII, grupo 16SrIII-B), se evaluó el patrón RFLP generado por la digestión con la enzima *MseI* del producto amplificado con los *primers* R16F2/R16R2 (1.2kb). Esta enzima genera dos patrones de restricción claramente distintos entre los fitoplasmas ChTYXIII y ChTDIII. Cada reacción estuvo compuesta por 100-200ng de producto de PCR, 5U de *MseI* (NEB, USA), 2µl de NEBuffer II 10X y H₂Omq hasta completar un volumen final de 20µl y se incubaron a 37°C durante 4 horas. Los patrones de restricción se evaluaron en geles de agarosa 1.5% (Biodynamics SRL, Argentina) + 0.5% agarosa Metaphor (BioWittaker Molecular Applications, UK) en buffer TBE 0.5X, teñidos con bromuro de etidio y visualizados en transiluminador UV. Como patrones de referencia se emplearon dos aislamientos, uno del fitoplasma ChTYXIII y otro del ChTDIII, previamente caracterizados. Los resultados de identificación se emplearon en la generación de mapas donde se mostraron cada uno de los puntos en donde se registró la presencia de uno u otro fitoplasma.

2.4 Ensayos de transmisión a ejemplares de paraíso sano y vinca sana en condiciones controladas

2.4.1 Transmisión del fitoplasma ChTYXIII mediante injerto de púa a paraíso sano

Con la finalidad de obtener un inóculo viable del fitoplasma ChTYXIII en invernadero, se realizaron injertos de púa sobre paraísos sanos a partir de material infectado (definidos mediante PCR y PCR-RFLP) proveniente de las localidades de Montecarlo, Posadas y Cerro Azul (provincia de Misiones). Los paraísos sanos se obtuvieron a partir de semillas botánicas (de una misma planta madre) y se germinaron en invernadero bajo condiciones controladas de humedad y temperatura, aislados de la

presencia de insectos mediante el empleo de malla antiáfidos dispuestos para tal fin. De las muestras infectadas se tomaron porciones de tallo sintomáticos jóvenes de entre 5-10 cm los cuales fueron injertados en paraísos sanos, de entre 3-5 meses de edad. Sobre cada ejemplar sano se realizaron entre 1-3 injertos, y para favorecer la adhesión de los mismos fueron sellados con Parafilm® y mantenidos en cámara húmeda durante 10 días. Posteriormente se evaluó el desarrollo de la sintomatología emergente y se controló la presencia de fitoplasmas mediante PCR con los *primers* universales P1/P7 y R16F2n/R16R2 según las condiciones descritas en el Capítulo II. Para confirmar la identidad del fitoplasmas se analizaron los patrones PCR-RFLP con las enzimas *MseI*, *HpaII*, *KpnI* y *HaeIII* (NEB, USA) siguiendo las condiciones descritas en 2.3.

2.4.2 Transmisión del fitoplasma ChTYXIII mediante *Cuscuta subinclusa* a vinca sana

Para transmitir el fitoplasma ChTYXIII desde paraíso infectado a vinca (*Catharanthus roseus*) se empleó el epífito *Cuscuta subinclusa*. Para ello, porciones de entre 3-5 cm del epífito crecido sobre plantas sanas de vinca fueron colocados sobre brotes jóvenes y sintomáticos de los paraísos infectados logrados en el punto anterior. Una vez adherido a este último, se acercaron ejemplares de vinca sana (provenientes de líneas isogénicas) para que se adhieran a esta. Tanto para la detección como en la identificación, se procedió según lo descrito en el punto anterior.

3. Resultados

3.1 Recolección de muestras de paraíso (*Melia azedarach* L.) con sintomatología de declinamiento en distintas regiones de la Argentina

Durante todo el muestreo se recolectaron 362 muestras, focalizándose la recolección en zonas donde el fitoplasmas ChTYXIII había sido registrado con anterioridad y zonas limítrofes a estas. La mayor densidad de puntos de muestreo se realizó en la zona noreste de la provincia de Santa Fe, norte y este de la provincia de Corrientes y sur de la provincia de Misiones con el objetivo de determinar con precisión el límite sur de la distribución del fitoplasma ChTYXIII (Figura 3.2).

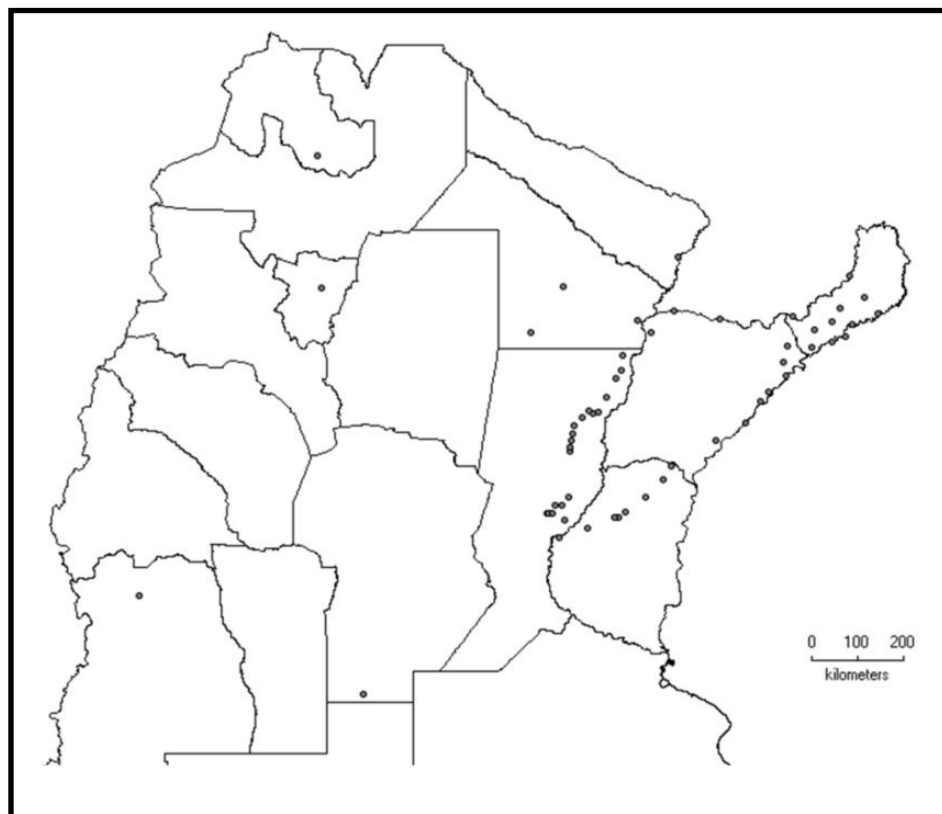


Figura 3.2: Mapa de la región Argentina en donde se muestran los distintos puntos de recolección de muestras de paraíso sintomático a lo largo de los años 2010, 2011 y 2012.

3.2 Detección e identificación del fitoplasma ChTYXIII mediante PCR y PCR-RFLP

De un total de 362 muestras analizadas, 314 resultaron positivas (86.74%) por PCR cuando se empleó el juego de *primers* universal R16F2n/R16R2. En los controles negativos no se observaron amplificaciones. De los 314 ejemplares PCR positivos, las muestras con patrón *MseI* característico del grupo 16SrIII representaron el 84.71% (266/314), mientras que el 15.29% restante (38/314) presentó un patrón *MseI* característico del grupo 16SrXIII (Tabla 3.1). No se observaron infecciones mixtas, dado que en ninguno de los casos se obtuvieron patrones RFLP combinados.

Tabla 3.1: Infecciones causadas por los fitoplasmas ChTYXIII y ChTDIII en cada una de las provincias muestreadas. **P.M.:** puntos de muestreo en los que se recolectó material en cada provincia; **N°:** número total de muestras sintomáticas recolectadas, **PCR (+):** número de muestras sintomáticas PCR positivas para fitoplasmas mediante PCR y **MseI ChTYXIII/ChTDIII:** número de muestras positivas con patrón *MseI* para los fitoplasmas ChTYXIII y ChTDIII.

| Provincia | P.M. | N° | PCR (+) | <i>MseI</i> ChTYXIII | <i>MseI</i> ChTDIII |
|--------------|-----------|------------|------------|----------------------|---------------------|
| Córdoba | 1 | 10 | 10 | 0 | 10 |
| Jujuy | 1 | 7 | 7 | 0 | 7 |
| Mendoza | 1 | 15 | 15 | 0 | 15 |
| Santa Fé | 20 | 65 | 46 | 0 | 46 |
| Entre Ríos | 7 | 20 | 18 | 0 | 18 |
| Corrientes | 9 | 60 | 56 | 8 | 48 |
| Chaco | 3 | 37 | 27 | 16 | 11 |
| Misiones | 23 | 89 | 85 | 21 | 64 |
| Formosa | 1 | 10 | 1 | 1 | 0 |
| Tucumán | 1 | 49 | 49 | 0 | 49 |
| Total | 67 | 362 | 314 | 38 | 266 |

3.3 Análisis de los patrones de distribución

Se determinó la presencia de los dos fitoplasmas en estudio para cada una de los puntos de muestreo previamente georeferenciados. Este análisis demostró una marcada diferencia en la distribución de los fitoplasmas ChTDIII y ChTYXIII, siendo el primero el que más ampliamente se halla distribuido a lo largo de los puntos de muestreo. De un total de 61 puntos en donde se registró la presencia de fitoplasmas, el ChTDIII fue detectado en 60, con excepción de Formosa, mientras que el fitoplasma ChTYXIII solo fue detectado en 13 puntos (Figura 3.3). Focalizando el análisis en la distribución del fitoplasma ChTYXIII, observamos que la misma se ve restringida principalmente a la provincia de Misiones, norte y este de la provincia de Corrientes, centro de la provincia del Chaco y en la provincia de Formosa, de la que sólo se cuenta con un punto de muestreo (Ciudad de Formosa) y en la cual se registró la presencia de un ejemplar infectado con el fitoplasma ChTYXIII. El punto más austral en el que se registró la presencia del ChTYXIII fue en la localidad de Yapeyú (suroeste de Corrientes) (29° 28' 0" Latitud Sur), aún cuando por debajo de dicha latitud se siguió registrando la presencia de la enfermedad pero solamente asociada al ChTDIII. Por encima de dicha latitud (29° 28' 0" Sur) pero hacia oeste, más precisamente la región Norte de la provincia de Santa Fe, no se registró en ningún caso la presencia del fitoplasma ChTYXIII, pero si la del fitoplasma ChTDIII.

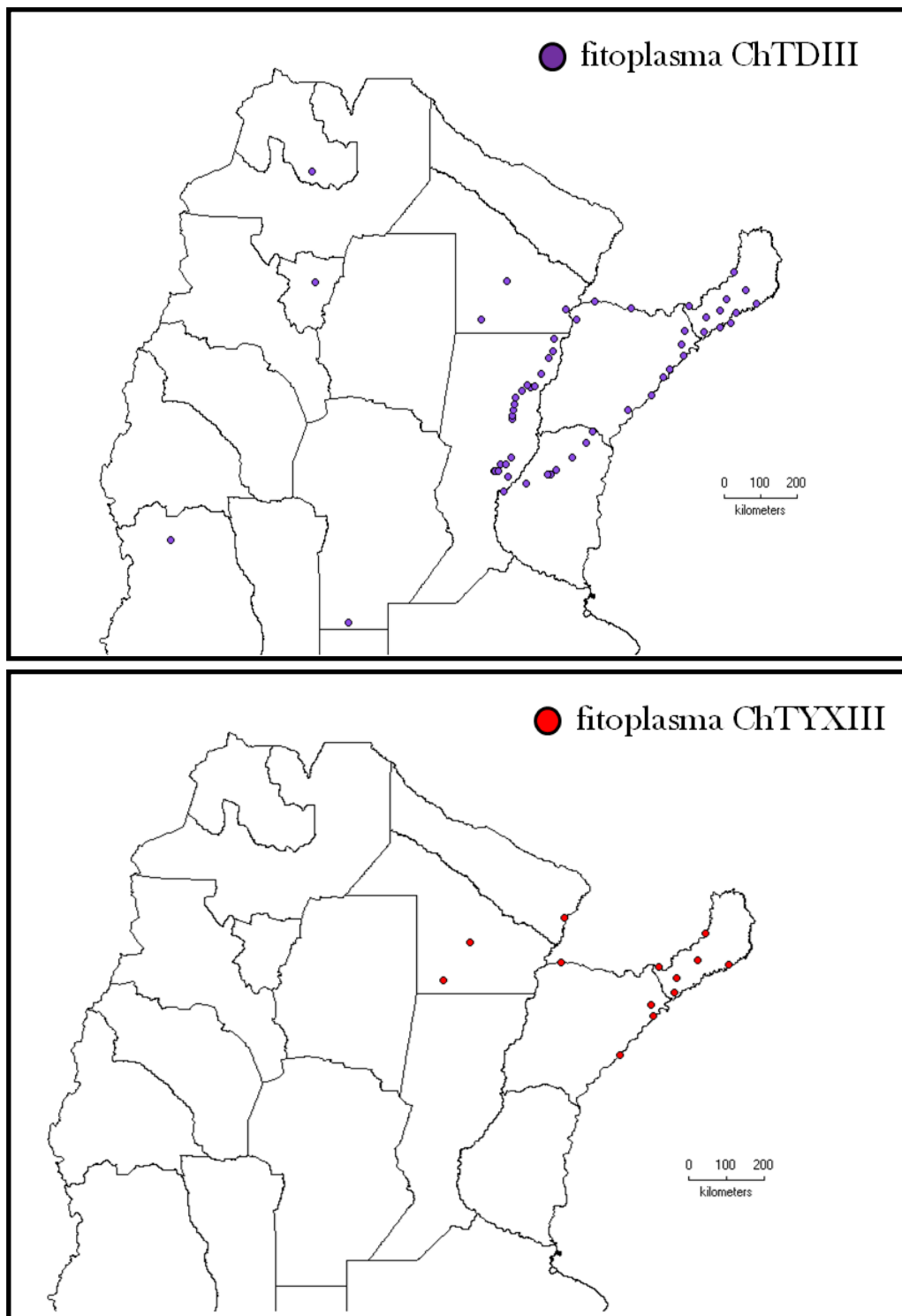


Figura 3.3: Puntos de muestro en donde fue detectada la presencia de los fitoplasmas ChTDIII (violeta) y ChTYXIII (rojo) a lo largo de todas las regiones abarcadas con este análisis.

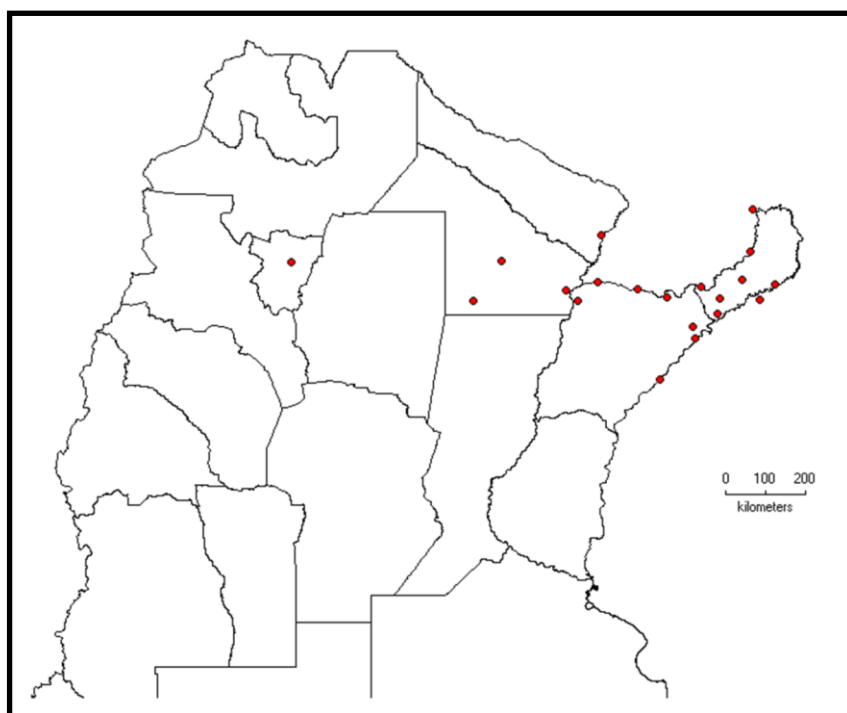


Figura 3.4: Distribución del fitoplasma ChTYXIII, basada en los estudios realizados en esta tesis y los datos aportados por el trabajo de Arneodo y col. (2007).

Por último, se compararon los datos obtenidos en el presente trabajo con aquellos obtenidos por Arneodo y col. (2007), en el que se analizó la distribución de los fitoplasmas ChTDIII y ChTYXIII. Si bien se observa correspondencia en los datos de dicho trabajo con los resultados de esta tesis, en nuestro trabajo no ha sido posible identificar muestras con infecciones mixtas y tampoco ha sido posible registrar la presencia del ChTYXIII en la provincia de Tucumán, como se registró en el trabajo mencionado. Para tener una idea más acabada acerca de la distribución del fitoplasma ChTYXIII se han incorporado los datos aportados por el trabajo de Arneodo y col. (2007) seleccionándose los sitios en donde se halló la presencia del fitoplasma ChTYXIII y se elaboró un mapa final con todos estos datos en conjunto (Figura 3.4).

3.4 Ensayos de transmisión a ejemplares de paraíso y vinca sana en condiciones de invernadero

3.4.1 Transmisión del fitoplasma ChTYXIII mediante injerto de púa a paraíso sano y descripción de la sintomatología

A partir de material infectado proveniente de las localidades de Montecarlo, Posadas y Cerro Azul, donde se demostró la presencia del ChTYXIII se realizaron un total de 45 injertos de púa sobre paraísos sanos principalmente en los meses de diciembre-enero-febrero (Figura 3.5), que es donde se observan la mayor cantidad de síntomas.

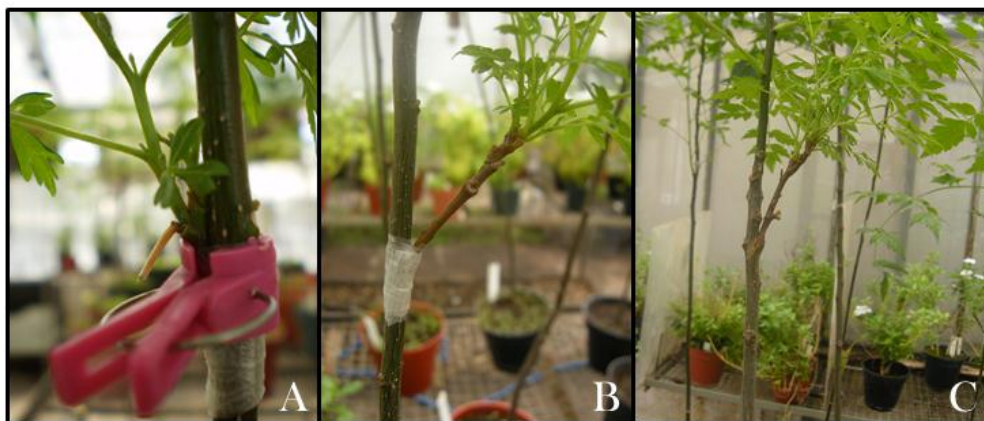


Figura 3.5: Detalle de los injertos realizados a partir de material infectado con el fitoplasma ChTYXIII. **A:** primera fase del injerto en donde se observa la adhesión de la púa infectada a la planta sana mediante el uso de nylon y pinzas especiales; **B:** segunda etapa donde la púa injertada comienza a unirse a la planta sana y ya existe comunicación con el sistema de conducción y **C:** etapa final donde el injerto está completamente unido a la planta, se observa callo cicatrizal y crecimiento del mismo.

De un total de 45 ejemplares injertados, 1 resultó positivo para fitoplasmas a los 8 meses de injertado con material proveniente de Montecarlo (Misiones). El análisis de los patrones PCR-RFLP demostró la presencia del fitoplasma ChTYXIII en el ejemplar analizado. A partir de este se realizaron nuevos injertos sobre paraísos sanos y se logró transmitir el patógeno a otros ejemplares. Respecto a la sintomatología encontrada en los paraísos infectados en invernadero, se observa en primera instancia un acortamiento de entrenudos, principalmente en la zona apical (Figura 3.6). Este síntoma se ve acompañado por un amarillamiento en las hojas que se inicia desde sus extremos y avanza hacia la nervadura la cual suele conservar la pigmentación verde característica (Figura 3.7). Por último, se observa pérdida de las hojas, las cuales caen tempranamente, con una diferencia de hasta dos meses respecto de los ejemplares sanos. Hasta el momento no se ha registrado presencia de necrosis y por lo general las ramas infectadas vuelven a generar hojas en el ciclo siguiente.



Figura 3.6: Paraísos infectados con el fitoplasma ChTYXIII a partir de injertos de púas, exhibiendo sintomatología de acortamiento de entrenudos y superbrotamiento. **A:** comparación entre un paraíso sano (PS) y paraíso enfermo (PE) donde se observa un marcado acortamiento de entrenudos en la zona apical, se remarca la zona en donde se realizó el injerto (i); **B:** detalle del superbrotamiento en la zona apical y **C:** detalle del superbrotamiento en el injerto.

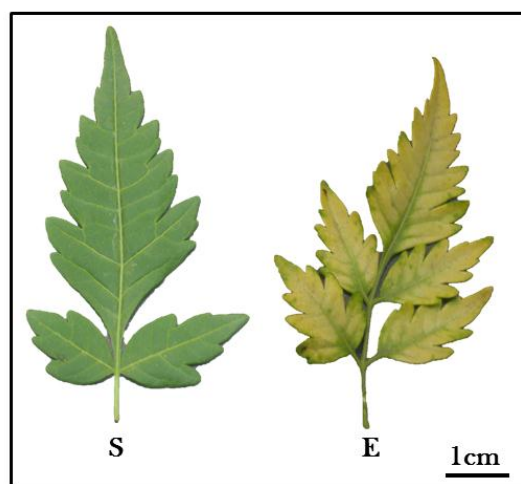


Figura 3.7: Sintomatología típica en hoja de paraíso infectada con el fitoplasma ChTYXIII. **S:** hoja asintomática; **E:** hoja enferma donde se nota un amarillamiento que avanza desde los extremos distales de la hoja hacia el centro.

3.4.2 Transmisión del fitoplasma ChTYXIII mediante *Cuscuta subinclusa* a vinca

Mediante el holoparasito *C. subinclusa* se logró transmitir el fitoplasma ChTYXIII, obtenido en el paso anterior, a un ejemplar de vinca. Se logró comprobar la presencia del fitoplasma ChTYXIII en 2 ejemplares sintomáticos. La sintomatología que desarrollan los ejemplares de vinca infectados, comienza con un amarillamiento (clorosis) que progresa en las hojas de las zonas cercanas al injerto y que luego se generaliza hacia el resto de la planta (Figura 3.8A y 3.8B). Este amarillamiento, al igual que en paraíso, progresa desde el extremos de las hojas hacia el centro (Figura 3.8E). Más adelante, se observa una marcada disminución del tamaño de las hojas nuevas (Figura 3.8E) y acortamiento de entrenudos (Figura 3.8D) y una disminución en la producción de flores. Por último la planta se vuelve completamente clorótica y muere.



Figura 3.8: Plantas de vinca infectadas con el fitoplasma ChTYXIII mostrando diversos síntomas. **A:** planta sana (izq.) planta infectada en los primeros estadios (centro) planta infectada en estadio más avanzado (der.), **B:** planta sana vs planta infectada con marcado amarillamiento, **C:** injerto de púa de vinca infectada sobre tallo de vinca sana, **D:** tallo sano vs tallo infectado mostrando acortamiento de entrenudos, sobretrotamiento y hojas cloróticas, y **E:** hoja sana vs hojas infectadas con distintos grados de clorosis y disminución de tamaño.

4. Discusiones

En el presente capítulo se ha aportado más evidencia acerca de la distribución de los fitoplasmas ChTDIII y ChTYXIII en Argentina. Nuestros resultados muestran que de los dos fitoplasmas asociados al *declinamiento del paraíso*, el ChTDIII es el que más ampliamente se encuentra distribuido a lo largo del territorio nacional. Este patrón de distribución no resulta extraño si se tienen en cuenta que los fitoplasmas pertenecientes al grupo 16SrIII o X-disease son los más comúnmente hallados en Sudamérica (Montano et al., 2000; Galdeano et al., 2004; Mello et al., 2006, 2011; Fiore et al., 2007, Davis et al., 2012; Galdeano et al., 2013, Pérez-López et al., 2015). Por su parte el subgrupo 16SrIII-B, no solo ha sido hallado asociado al declinamiento del paraíso sino que además ha sido reportado afectando otras especies tales como duraznero *Prunus persicae* (Fernández et al., 2013a), tomate *Solanum lycopersicum*, vinca *Catharanthus roseus* L., lagaña de perro *Caesalpinia gilliesii* (Galdeano et al., 2013), y la hierba *Leonurus sibiricus* (Flôres y Bedendo, 2013), entre otras. Podría presumirse, entonces, que el hecho de la presencia de fitoplasmas del subgrupo 16SrIII-B en varios hospedantes podría estar ocasionado por la presencia de un insecto vector polífago de amplia distribución en Sudamérica o bien la presencia de varios insectos vectores. Siguiendo esta última hipótesis, estudios recientes en Brasil han demostrado la presencia de fitoplasmas pertenecientes al grupo 16SrIII en cinco especies de Cicadellidos (Eckstein et al., 2014), los cuales podrían ser considerados como potenciales vectores.

Respecto del fitoplasma ChTYXIII, los datos aportados por el presente trabajo sumados a los aportados en trabajos anteriores (Arneodo et al., 2007) han demostrado que la distribución en la Argentina está claramente asociada a la zona noroeste. Tanto la zona norte de Corrientes como la zona sur y centro de la provincia de Misiones, fueron las que mayor cantidad de ejemplares infectados con el fitoplasma ChTYXIII presentaron. En las provincias de Chaco y Formosa, de las que se tienen 3 y 1 punto de muestreo respectivamente, también ha sido posible registrar la presencia del fitoplasma. Los resultados de este trabajo han permitido también conocer con mayor precisión los límites de la distribución hacia el sur del fitoplasmas ChTYXIII. El punto más austral en donde la presencia de dicho fitoplasmas fue registrado fue la localidad de Yapeyú

(sureste de Corrientes, 29° 28' 0" Latitud Sur). Por debajo de dicha latitud se han seguido registrando la presencia de paraísos sintomáticos e infectados con fitoplasmas, pero todos ellos con el ChTDIII. Por encima de esta latitud, pero hacia el oeste (provincia Santa Fe), no hemos detectado al fitoplasma ChTYXIII pero si al ChTDIII. A modo de hipótesis podemos especular que dicho patrón de distribución podría estar sujeto a la distribución de lo/s insectos vector/es de dicho fitoplasma, y sería por ello que a pesar de existir la disponibilidad de hospedante por fuera de esa zona, dado que no existen insectos vectores el fitoplasma ChTYXIII no se encuentra presente. Para el caso del fitoplasma ChTDIII serían otros los insectos vectores intervinientes, los cuales podrían tener un rango de distribución mayor y es por ello que su distribución es más amplia. El hecho de haberse registrado la presencia de este fitoplasma en otras regiones por fuera de su distribución natural, por ej. Tucumán (Arneodo et al., 2007), podría deberse al comercio y traslado de plantines infectados provenientes de la provincia de Misiones hacia esas zonas, ya que existen casos en los que se ha registrado dicho comercio (Gaillard de Benitez et al., 2002).

En este trabajo también se ha conseguido mantener un inoculo viable del fitoplasma 16SrXIII en invernadero tanto en plantas de paraíso, como en plantas de vinca. La sintomatología encontrada en los paraísos infectados se caracteriza por la presencia de un marcado acortamiento de entrenudos en la zona apical, clorosis y disminución del tamaño de hojas y superbrotamiento de brotes laterales en algunos casos. Esta sintomatología descrita en invernadero se corresponde con aquella registrada en las infecciones naturales (Harrison et al., 2003, Arneodo et al., 2005, 2007, Duarte et al., 2009). Sin embargo sería necesario trabajar con ejemplares mas adultos para tener una mejor idea del desarrollo sintomatológico de la enfermedad. Por su parte en vinca, la sintomatología se desarrolla en primera instancia como una clorosis que avanza desde la zona cercana al injerto para luego propagarse hacia el resto de la planta. La sintomatología progresa manifestando un acortamiento en los entrenudos y disminución del tamaño foliar, acompañado por una clorosis generalizada que culmina con la muerte de la planta. Si bien se trata de otro hospedante, tanto en paraíso como en vinca se observaron patrones comunes tanto en el acortamiento de entrenudos como en la

clorosis. Respecto a esta última, ambos hospedantes manifestaron un progreso de dicha clorosis desde los extremos de la lámina hacia el interior.

La puesta a punto de este sistema de propoagacion del fitoplasmas ChTYXIII resulta de vital importancia, ya que nos permite contar con material fresco para realizar otra clase de estudios (genómicas, serológicos), asic como tambien evaluar aspectos fisiológicos, de expresión diferencial de genes o cinetica de la infección, entre otros.

Capítulo IV

Inmunolocalización del fitoplasma *China tree yellows*

1. Introducción

En las bacterias existen al menos cinco sistemas de exportación de proteínas, no homólogos entre sí, que les permiten no solo la construcción de sus membranas sino que además participan en la secreción de toxinas, adhesinas y enzimas hidrolíticas. De estos cinco sistemas solo uno, el sistema sec (de secreción), es esencial para la viabilidad de las células (Economou, 1999) (Figura 4.1). Este sistema o "translocón sec" se encuentra conservado en todos los dominios de la vida (Bacteria, Archaea y Eukarya). En Bacteria, el sistema sec, está conformado en primera instancia por 3 proteínas que conforman un canal conductor denominado complejo SecYEG, compuesto por las proteínas SecY, SecE y SecG (Driessen y Nouwen, 2008; Du Plessis et al., 2011). Otras proteínas que participan en funciones auxiliares son, la proteína SecB (Driessen, 2001; Driessen y Nouwen, 2008) y el complejo de proteínas de membrana denominado SecDFYajC (Duong y Wickner, 1997).

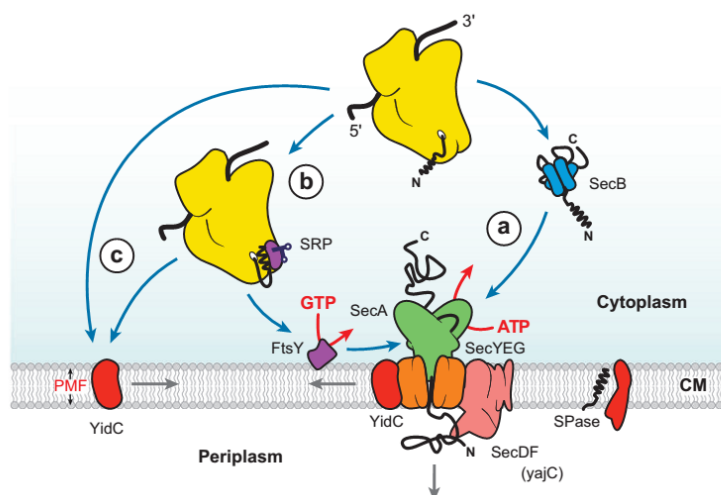


Figura 4.1: Esquema de direccionamiento de proteínas al translocón sec. El translocón sec bacteriano es un complejo de proteínas inserto en membrana citoplasmática (CM), que comprende un dominio motor periférico o proteína SecA (verde), el canal proteico conductor SecYEG (naranja) y las proteínas accesorias SecDF (yajC) (rosa) y YidC (rojo). SPase es una peptidasa unida a la membrana que escinde la secuencia señal de las preproteínas en la cara periplásmica de la membrana. (a) las proteínas de secreción (amarillo) son dirigidas al translocón sec después de la traducción, en función de su secuencia señal, que es reconocida directamente por secA, el dominio motor de la translocasa Sec, o con la ayuda de la chaperona molecular SecB (azul). (b) proteínas de membrana y algunas preproteínas co-traducionalmente dirigidas al translocón sec (c) algunas proteínas de membrana se insertan en la membrana citoplasmática a través YidC (tomado de Driessen y Nouwen, 2008)

Un componente central del sistema de translocación sec es la proteína secA, la cual funciona como el motor energético en la translocación de proteínas y de los dominios hidrofílicos de las proteínas de membrana a través de la misma (Du Plessis et al., 2011). La proteína secA, es fundamental en la secreción bacteriana, ya que no solo provee la unión física en la mayoría de los componentes de la reacción, sino que además administra el mecanismo de conversión de energía necesario para la comunicación entre las subunidades del sistema y el trabajo de translocación. A su vez, esta proteína es única de bacterias y organelas ya que en los organismos eucariotas el translocón emplea una ATP-asa distinta (Economou, 1999).

En trabajos llevados a cabo en el “*Candidatus phytoplasma asteris*” (cepa OY-M), se ha logrado identificar a los genes que codifican las proteínas SecA, SecY y SecE (componentes principales del translocón sec), se ha demostrado la expresión de la proteína secA en tejidos infectados (Kakizawa et al., 2001, 2004), y se ha comprobado la funcionalidad de dicho sistema (Kakizawa et al., 2004). Por otro lado, el gen que codifica la proteína secY ha sido clonado y analizado en numerosos fitoplasmas (Lee et al., 2010). Estos resultados han demostrado la funcionalidad del sistema sec en fitoplasmas, por lo que proteínas tales como adhesinas, proteasas, enzimas hidrolíticas y proteínas efectoras pueden estar siendo transportadas directamente desde el citoplasma de los fitoplasmas hacia la superficie de la célula o hacia el citoplasma de las células hospedantes vía translocón sec (Sugio et al., 2011b).

Dada la imposibilidad del cultivo *in vitro*, sumado al bajo título y la distribución desigual en los tejidos que infectan, la detección de los fitoplasmas ha sido dificultosa (Kirkpatrick et al, 1987, Lee et al., 2000). Sin embargo, durante la década del 80, el desarrollo de pruebas moleculares tales como los anticuerpos mono y policlonales, las pruebas de hibridación de ADN y el desarrollo de la técnica de PCR ha permitido un gran avance en el diagnóstico, la caracterización y el estudio de la diversidad de estos patógenos (Lee et al., 2000).

El primer antisuero en contra de fitoplasmas fue generado en 1974, empleándose como inmunógeno una preparación de fitoplasmas parcialmente purificada (Sinha y Chiykowski, 1974). Desde allí, preparaciones enriquecidas o parcialmente enriquecidas

con fitoplasmas han sido empleadas para la generación de anticuerpos mono y policlonales en contra de numerosas cepas de fitoplasmas como por ejemplo, *aster yellows* (Errampalli y Fletcher, 1989), *clover phyllody* (Garnier et al., 1990), *grapevine flavescence dorée* (Bodoun-Padieu et al., 1989) y *maize bush stunt* (Cheng y Jiang, 1988) entre otros. En Argentina, Gomez y col. (1996) generaron un anticuerpo policlonal en contra del fitoplasma agente causal del declinamiento del paraíso (*China tree decline*, 16SrIII-B). En este trabajo se empleó como inmunógeno, preparaciones enriquecidas del fitoplasma generadas a partir de la purificación en gradientes de percoll. El antisuero policlonal generado fue capaz de discriminar entre planta enferma y sana e incluso reconocer otros fitoplasmas presentes en ajo (*Allium sativum*), durazneros (*Prunus persica*) y tona (*Tona ciliata*) (Gomez et al., 1996). Estas estrategias sin embargo presentan algunas limitaciones tales como la escasa reacción en tejidos con bajo título del patógeno, la baja especificidad e incluso reacción cruzada contra proteínas de planta (Kakizawa et al., 2001).

Para suplir estas deficiencias una estrategia ampliamente utilizada en la producción de anticuerpos en contra de fitoplasmas, consiste en el clonado y expresión de proteínas de fitoplasmas en sistemas bacterianos (*E. coli*), la posterior purificación de la proteína recombinante, y por último la inmunización a conejos (Kakizawa et al., 2001). Esta estrategia ha sido utilizada exitosamente en el desarrollo de anticuerpos en contra de proteínas inmunodominantes de membrana de numerosos fitoplasmas (Barbara et al., 2002; Kakizawa et al., 2006a; Galleto et al., 2008; Arashida et al., 2008; Kakizawa et al., 2009; Fabre et al., 2011; Boonrod et al., 2012; Siampour et al., 2012; Shahryari et al., 2013).

La proteína secA de bacterias presenta valores de homología bajos respecto a la encontrada en cloroplastos (Wei et al., 2004) y además posee motivos altamente conservados entre un gran número de especies bacterianas (Kakisawa et al., 2001). En estudios previos se ha generado un anticuerpo en contra de la proteína secA, basados en la tecnología de proteína recombinante (Kakizawa et al., 2001), el cual fue capaz de reconocer fitoplasmas de distintos orígenes filogenéticos en tejidos de planta infectados mediante inmunohistoquímica (Wei et al., 2004). A su vez, un estudio reciente ha evaluado la generación de anticuerpos monoclonales en contra de la proteína secA para

su empleo como herramienta de diagnóstico mediante la técnica de ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), con resultados negativos, sugiriendo que la proteína secA no se está expresando en niveles altos en el tejido infectado y por ello no sería una proteína adecuada para la detección rutinaria de fitoplasmas, aunque sí para la inmunolocalización de estos patógenos en estudios experimentales o tejido específicos (Hodgetts et al., 2014). Otros estudios, demostraron que la utilización en conjunto del suero generado en contra de la proteína secA (Kakizawa et al., 2001) y otros métodos de tinción (aniline blue, DAPI), resultó beneficioso para comprender mecanismos histopatológicos de la enfermedad causadas por el fitoplasma *onion yellows* OY (Oshima et al., 2001).

Contar con un anticuerpo capaz de reconocer de manera altamente sensitiva y de resolución fina, resultaría una herramienta robusta y de gran utilidad principalmente para el estudio de la localización del patógeno en los tejidos infectados. Dados los aspectos anteriormente mencionados, se ha seleccionado la proteína secA del fitoplasma ChTYXIII para la generación de un anticuerpo policlonal.

Dado lo anteriormente expuesto se propone el siguiente objetivo específico:

Objetivo específico 3: Producir un reactivo de diagnóstico, basado en la producción de antisueros con proteínas recombinantes en contra de la proteína secA, tanto para la detección como para la inmunolocalización en tejidos infectados.

2. Materiales y métodos

2.1 Amplificación del segmento interno del gen de la proteína secA

Para la amplificación de un segmento interno del gen que codifica la proteína secA se empleó el juego de *primers* secAFw1/secARv1 (Hodgetts et al., 2008). Este juego de primers, amplifican un fragmento de 840pb aproximadamente, el cual contiene a su vez el fragmento de 0.5kb descrito anteriormente por Kakizawa y col. (2001). Este segmento de 840pb fue elegido ya codifica a un péptido (putativo) de ~32kDa el cual presenta dentro de toda la secuencia aminoacídica de la proteína secA, los valores de antigenicidad mas altos. Se empleó ADN total de paraíso infectado con el fitoplasma ChTYXIII (aislamiento Montecarlo, Misiones) mantenido en invernadero. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 40µl, conteniendo 0.4µM de cada primer, 100µM de dNTPs, 1U de GoTaq® polymerase (Promega, USA) y buffer 5X siguiendo las condiciones propuestas por Hoghetts y col. (2008).

2.2 Clonado del fragmento amplificado en el vector pBluescript SK (II) +

El producto amplificado de 840pb se purificó mediante columnas ilustra Microspin S-400 HR (GE, UK) de acuerdo a las condiciones del fabricante. El fragmento purificado fue tratado con el enzima Klenow (NEB, USA) para generar extremos del tipo romo. Luego, el fragmento tratado se clonó en el sitio *SmaI* del plasmido pBluescript SK (II) + mediante el uso del kit comercial Quick Ligation™ Kit (NEB, USA) de acuerdo a las condiciones del fabricante. Por último, células *E.coli* competentes DH5α se transformaron con el producto de ligación. La selección de bacterias transformadas se hizo por resistencia a ampicilina (gen de resistencia presente en el vector PBLuescript SK (II) +. La identificación de colonias portadoras de plásmidos recombinantes se hizo por el método de α-complementación del gen de la β-galactosidasa (*lacZ*). Las bacterias transformadas se sembraron en cajas de Petri con medio LB (Luria Bertani) sólido + 0,1 mg/ml de ampicilina + 0,4 mg/ml de IPTG (isopropiltiol-β-D-galactósido) + 40 µg/ml de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactósido) y se incubaron en estufa a 37°C durante 16 h. Se seleccionaron las colonias de color blanco y se confirmó la presencia de los plásmidos recombinantes por PCR de colonia empleando cebadores pUC/M13-fwd y pUC/M13-rev los cuales presentan sitios

de hibridación por fuera del sitio de clonado en el plásmido. Otro de los controles realizados fue la liberación del inserto mediante la enzima de restricción *PvuII* (NEB, USA) a partir del ADN del plásmido purificado. Se seleccionaron 2 clones para su secuenciación desde ambos extremos, lo cual fue llevado a cabo por Macrogen, Corea.

2.3 Análisis de la secuencia

Las secuencias de los clones se ensamblaron mediante el software SeqMan (DNASTar), y la secuencia final resultante se comparó con otras depositadas en banco de datos (NCBI) utilizando BLASTn. Posteriormente, se determinó el marco abierto de lectura del fragmento interno de la secuencia de la proteína *secA* (840pb) mediante el software ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>). Una vez determinado el ORF (*secA*-ORF), la secuencia de aminoácidos correspondiente fue analizada mediante el software DNASTar (propiedades fisicoquímicas elementales y perfiles de antigenicidad), además otros análisis como la ubicación subcelular putativa (PSORT prediction program, <http://psort.hgc.jp>) o hidrofobicidad (SOSUI program; <http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosuiy>) análisis de dominios conservados (Conserved Domains Database, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>).

2.4 Expresión de la proteína recombinante en un sistema procariota

2.4.1 Clonado en fase del ORF-*secA* en el vector de expresión pET-30 a (+)

El ORF-*secA* del plásmido pBluescript II (SK+) fue liberado mediante la digestión con las enzimas *EcoRI* y *NotI* (NEB, USA). El fragmento liberado fue purificado cortando en un gel de agarosa al 1% la banda del tamaño correspondiente, utilizando un kit comercial (QIAGEN, Alemania) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El fragmento purificado se clonó en fase en el vector de expresión pET-30 a (+) (Novagen, USA), el cual fue previamente digerido con las mismas enzimas. Una vez clonado el ORF-*secA* en el vector de expresión, se transformaron células competentes de *E. coli* DH5 α , se seleccionaron colonias mediante PCR de colonia utilizando *primers* específicos y por liberación del inserto con las enzimas *EcoRI* y *NotI*, demostrando la presencia e inserción correcta de la secuencia. Estos resultados también fueron corroborados mediante secuenciación de los plásmidos recombinantes.

2.4.2 Expresión del ORF-secA en *E. coli* BL21 (DE3)

Para proceder con la expresión del ORF-secA, se transformaron células de *E. coli* BL21 (DE3) competentes, con los plásmidos recombinantes obtenidos en el paso anterior, siguiendo procedimientos ya establecidos (Sambrook et al., 1989). Posteriormente, se seleccionaron colonias transformantes mediante PCR de colonia utilizando *primers* específicos y mediante restricción con enzimas. La expresión de la proteína recombinante secA (~38kDa= 32kDa proteína original + 6 kDa residuo His-Tag), se llevó a cabo a partir de clones transformantes incubados en medio líquido LB con 1mM de IPTG, aireación y agitación continua (~150 rpm) a 25°C durante 1, 3, 6 y 16 horas. La producción de proteína recombinante se evaluó mediante PAGE-SDS al 12% teñidos con Azul Brillante de Coomassie. Como control se emplearon células *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con el plásmido pET 30a (+) sin modificar.

2.5 Purificación de la proteína recombinante

2.5.1 Ruptura de los cuerpos de inclusión

Una vez comprobada la producción de la proteína recombinante se procedió a la purificación de la misma con la finalidad de sensibilizar conejos para la generación del antisuero policlonal. Debido a que durante su producción la proteína recombinante forma cuerpos de inclusión, se evaluaron 4 protocolos para lograr la ruptura de dichos cuerpos. Estos protocolos se detallan a continuación:

Protocolo 1: Se seleccionó un clon recombinante expresante del ORF-secA y se indujo la producción de la proteína recombinante en 15ml de medio LB líquido + 1mM de IPTG durante 16 horas a 37°C y 150 rpm. Los 15 ml de cultivo fueron luego trasvasados a un tubo estériles de polipropileno 50ml, los cuales fueron centrifugados a 3000rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se descartó y el pellet fue disuelto en 1 ml de tampón de lisis (50mM Tris-HCl pH 8, 1mM EDTA pH 8 y 100mM NaCl). Posteriormente se adicionó un inhibidor de proteasas PMSF (Phenylmethylsulfonyl Fluoride, SIGMA, USA) en una concentración de 1mM para evitar la degradación de las proteínas purificadas, 0,24 mg/ml de lizosima (Sigma, USA) y se incubó a T° ambiente durante 1 hora. En el siguiente paso se agregaron 8 mg de Ácido Deoxicólico (SIGMA, USA) y se incubó 20 minutos a T° ambiente. Luego se adicionó 200U de

DNAsa y se incubó 30 minutos a T° ambiente. El homogenizado fue centrifugado a 12000 rpm durante 15 minutos y se recuperó el sobrenadante (SN1). El pellet obtenido se resuspendió en 1ml de tampón de lavado (50mM Tris-HCl pH 8, 10mM EDTA pH 8 y 100mM NaCl) y se tomó una alícuota (P1). Posteriormente se centrifugó a 12000 rpm durante 15 minutos y se recuperó el sobrenadante (SN1). El pellet generado en esta etapa se resuspendió en 1ml tampón lisis más SDS 1% final (P2), en agitación lenta durante 3 horas, se centrifugó a 12000 rpm durante 15 minutos recuperándose el sobrenadante (SN2). Por último el pellet obtenido se resuspendió en 1ml de tampón lisis y se tomó una alícuota del mismo (P3).

Protocolo 2: el pellet P1 se resuspendió en buffer lisis más Tritón X-100 0,5 %

Protocolo 3: el pellet P1 se resuspendió en buffer lisis más Nonidet P-40 0,5 %

Protocolo 4: el pellet P1 se resuspendió en buffer lisis más SDS 1%

Los resultados de cada uno de los protocolos fueron analizados en geles SDS-PAGE 12% teñidos con azul brillante de Coomassie.

2.5.2 Purificación de la proteína recombinante mediante electroelución

La electroelución consiste en la extracción de la fracción correspondiente a la proteína recombinante secA a partir de geles SDS-PAGE al 12%. La banda correspondiente a la proteína (~38kDa) fue seccionada del gel e incluida dentro de membranas de diálisis (SIGMA, USA) con 0.5 ml de buffer Tris-Glicina 0.5X. Posteriormente las membranas fueron cerradas herméticamente y sometidas a un campo eléctrico constante de 100 voltios durante una hora en cuba de electroforesis horizontal con buffer Tris-Glicina 0.5X. La proteína recombinante eluída se recuperó en el buffer dentro de la membrana y se evaluó la calidad y tamaño de la proteína purificada mediante geles SDS-PAGE al 12%. Su concentración se midió mediante la técnica de Lowry (Lowry et al., 1951). Este procedimiento fue repetido en varias oportunidades con la finalidad de obtener proteína recombinante suficiente para realizar los ensayos de inoculación a conejos y posteriores análisis del suero.

2.6 Sensibilización de conejos con la proteína recombinante secA purificada

Para la generación de un suero policlonal específico contra la proteína secA (As-secA) de fitoplasma, se inocularon conejos californianos de aproximadamente 3 meses de edad con proteína recombinante purificada. Previo a la 1° sensibilización se realizó la extracción del suero denominado preimmune (SP) para establecer, mediante la técnica de Western Blot, la existencia de reacción inespecífica contra de proteína total de planta sana de paraíso, frutilla, vinca y alfalfa. Se eligieron estas especies de plantas ya que son hospedantes de los fitoplasmas con los que comúnmente se trabaja en este laboratorio. De un grupo inicial de 4 conejos se descartaron 3 por presentar una fuerte reacción contra proteínas normales de la planta, principalmente contra alfalfa. El conejo que presentó menor reacción contra proteína de planta fue el seleccionado para realizar las inmunizaciones, las cuales consistieron en primera instancia de dos inyecciones intradérmicas de 150 ug de proteína secA purificada con igual cantidad de adyuvante completo de Freund (Sigma, USA). A los 15 días se hizo la primera sangría (S1), separando el suero por temperatura y centrifugación diferencial. Tanto este suero como los posteriores fueron almacenados a -20C° en glicerol estéril 50% para evitar su congelamiento. Transcurridos 10 días desde la S1 se procedió con la segunda inoculación que consistió de dos inyecciones intramusculares de 150 ug de proteína en cada una con adyuvante medio de Freund. Las sangrías S2 y S3 se recolectaron a los 10 y 20 días posteriores a la 2da sensibilización respectivamente. La 3ra sensibilización se llevó a cabo conjuntamente con la sangría S3, procediéndose del mismo modo que en la segunda inoculación. Posteriormente se recolectaron las sangrías S4, S5, S6 y S7 a los 7, 15, 30 y 40 días respectivamente. A los 15 días posteriores a la S7 se procedió con la última inyección que consistió en una sola aplicación de 100ug de proteína vía intravenosa; recolectándose las sangrías S8 y S9 a los 7 y 15 días posteriores, respectivamente (Figura 4.2).



Figura 4.2: Esquema cronológico en donde se indican cada una de las sensibilizaciones (flechas superiores) y cada una de las sangrías (flechas inferiores).

2.7 Prueba de la sensibilidad y especificidad de los sueros obtenidos

Se comprobó la sensibilidad y especificidad del suero obtenido mediante la técnica de PTA-ELISA (Plated Trapped Antigen-ELISA) en contra de la proteína recombinante secA purificada y lisado bacteriano (*E. coli* BL21 transformadas con pET 30 (a) wild type). Para cada una de las sangrías (S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7, S8 y S9) se contrastaron 10 diluciones seriadas de suero (1:1000, 1:2000, 1:4000, 1:8000, 1:16000, 1:32000, 1:64000, 1:128000, 1:256000 y 1:512000) y dos concentraciones de proteína (S) y de lisado bacteriano (B): 50 ng y 500 ng. La lectura de las placas se llevó a cabo en los tiempos: 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 60 minutos, 90 minutos, 120 minutos y 16 horas (toda la noche).

2.8 Evaluación del suero frente tejido de planta mediante NC-ELISA

La reactividad del suero fue evaluada tanto frente a proteína total de planta infectada con el fitoplasma ChTYXIII (aislamiento Montecarlo), en vinca y paraíso (inóculos mantenidos en invernadero) como frente a proteína total de planta sana. El tejido vegetal se molió en buffer de extracción (TBS 1X, DIECA (Diethyldithio-Carbamic Acid, Sigma) 0.01% p/v; EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid, Sigma) 0.01 % p/v) en una relación peso/volumen 1/5(1g/5ml). A partir de este se realizaron dos diluciones seriadas 1/10 y 1/20 con el mismo buffer. Como controles de reacción se emplearon proteína recombinante secA purificada (50ng) y lisado bacteriano (50ng). Las membranas NC (Pure Nitrocelulose Membrane 0.45µm) (Bio-Rad, USA) se sembraron con 100µL de las extracciones y se bloquearon durante 16 horas a temperatura ambiente en buffer de bloqueo TBS1X (50 mM Tris-Cl, pH 7.6; 150 mM NaCl) + leche descremada 5% + Tritón[®] X-100 (Promega, USA) 2%. Posteriormente las membranas se lavaron 3 veces durante 3 minutos en buffer TBS1X + Tween-20 (0.05% v/v) y luego se incubaron con el suero policlonal (anticuerpo primario), el cual fue utilizado en dos diluciones (1/1000 y 1/2000), durante 2 horas a temperatura ambiente. Luego, se lavaron tal cual fue mencionado anteriormente y fueron incubadas con el anticuerpo secundario (anti IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina) el cual fue utilizado en una dilución 1:3000, durante 1 hora a temperatura ambiente. Por último, las membranas fueron lavadas nuevamente y reveladas en tampón sustrato (NBT (Nitrotetrazolium

Blue chloride, Sigma) 0.05 % p/v, BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate disodium, Sigma) 0.015% p/v) y se evaluó la reacción colorimétrica a través del tiempo.

2.9 Evaluación del suero mediante Inmunohistoquímica

La técnica inmunohistoquímica permite determinar si el suero policlonal en contra de la proteína secA es capaz de reconocer de manera diferencial la presencia de dicha proteína en tejidos vegetales infectados. Esta técnica requiere, en primera instancia, la generación de cortes ultrafinos del tejido vegetal, los cuales se logran con las técnicas clásicas de inclusión en parafinas y el empleo de micrótomos. Una vez conseguidos estos cortes, se exponen los tejidos vegetales primero al anticuerpo 1° (anticuerpo específico en contra de la proteína diana). Luego para revelar la ubicación (inmunolocalización) de la proteína de interés, se emplea un anticuerpo 2° (anti IgG, fosfatasa alcalina). La unión específica **proteína diana-anticuerpo 1°-anticuerpo 2°** se revela colorimétricamente por la acción de la fosfatasa alcalina en contacto con sustrato (NBT-BCIP), generando una coloración del tipo azul-violeta la cual se deposita específicamente sobre la porción del tejido correspondiente pudiéndose observar sin dificultades en el microscopio óptico. A continuación se detallan cada uno de los pasos en el procedimiento empleado:

2.9.1 Cortes histológicos

2.9.1.1 Fijación de los tejidos vegetales

Porciones de tallo, nervadura central y peciolo de 5 plantas de paraíso y 4 plantas de vinca, ambas infectadas con el fitoplasma ChTYXIII y mantenidas en invernadero, más sus respectivos controles sanos, se fijaron en buffer de fijación de Paraformaldehído 4% p/v disuelto en buffer fosfato de sodio 0.1M pH 7.5 (20mM NaH₂PO₄, 76mM Na₂HPO₄) durante al menos 48 horas.

2.9.1.2 Deshidratación de las muestras

Previo a la inclusión se deshidrataron las muestras mediante una serie creciente de etanol (50, 70, 80, 96 y 100%). Posteriormente, las muestras fueron clarificadas en una mezcla de etanol 100%: xilol en proporciones 3:1, 1:1 y 1:3 durante 3 horas en cada una, dejándolas 24 horas en xilol 100%.

2.9.1.3 Infiltración de las muestras

Para lograr la infiltración de la parafina en el interior de las muestras, se las pasó del xilol al 100% a una mezcla de parafina fundida y xilol en proporciones 1:3, 1:1 y 3:1 durante 2 horas en cada una, manteniendo temperatura constante de 55-60°C. Posteriormente se las dejó en parafina pura fundida durante 24 horas a 55-60°C. Por último se montaron las muestras en cajas de papel (4x4x4 cm) y se formaron panes que serán empleados en las etapas siguientes.

2.9.1.4 Montaje y seccionamiento de las muestras

Los *panes* de parafina fueron montados en tacos de madera mediante calor. Para el seccionamiento de las muestras se empleó un micrótomo manual rotativo (Accu-Cut® SRM™ 200, Sakura). Los tacos se montaron en el micrótomo y se realizaron cortes seriados de 10µm. Las tiras de cortes se montaron sobre portaobjetos con una gota de agua por debajo y mediante calor fueron adheridos al mismo. Para completar la adhesión y eliminar restos de agua los preparados fueron incubados durante 48 horas a 37 grados.

2.9.2 Inmunolocalización de fitoplasmas en cortes histológicos de tejidos enfermos y sanos utilizando el suero policlonal anti secA

2.9.2.1 Desparafinado y rehidratación de la muestra

Una vez fijado el material al portaobjetos las muestras fueron rehidratadas en xilol 100%, y luego en una serie decreciente de etanol (100, 97, 80, 70 y 50%) con una duración de 5 minutos en cada serie realizadas a temperatura ambiente.

2.9.2.2 Bloqueo e Incubación con anticuerpo primario

El bloqueo de los preparados se realizó sumergiendo los mismos en buffer de bloqueo PBS1X (120 mM NaCl, 7 mM Na₂HPO₄, 3 mM NaH₂PO₄, and 2.7 mM KCl) + 5% leche descremada durante 1 hora a T° ambiente. Posteriormente al bloqueo, los preparados se incubaron durante 16 horas a 4°C con el anticuerpo anti secA (dilución 1:1000) en buffer de bloqueo. Después del bloqueo fueron lavados con PBS + Tween-20 (Promega, USA) al 1.05% durante 20 minutos.

2.9.2.3 Incubación con anticuerpo secundario anti-conejo

Los preparados se incubaron con el anticuerpo secundario (Anti-Rabbit IgG Alkaline phosphatase antibody- produced in goat BioRad, USA) dilución 1:1000 en buffer de bloqueo durante 1 hora a T° ambiente. Luego, estos se lavaron con TBS + Tween-20 al 1.05% durante 20 minutos y con buffer AP (100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, and 100 mM Tris-HCl, pH 9.5) se hicieron 2 lavados de 3 minutos cada uno.

2.9.2.4 Coloración de los preparados

Los preparados fueron coloreados sumergiéndolos en solución de tinte (0.34mg/ml de NBT y 0.175 mg/ml de BCIP diluidos en buffer AP) durante 15-30 minutos deteniéndose la reacción con buffer TE pH 7.5 (10mM Tris, 1mM EDTA). En las porciones de tejido donde hubiese habido unión específica del anticuerpo 1° (anti-secA) y luego del secundario marcado con fosfatasa alcalina, debería observarse una coloración azul-violeta.

2.9.2.4 Montaje de los preparados

Una vez coloreada la muestra se la volvió a deshidratar mediante el uso de una serie creciente de etanol (50-70-80-97-100%), luego xilol 100% y por último se adicionó cuidadosamente una gota de bálsamo de Canadá sintético (Biopack, Argentina) sobre el cubreobjetos. Los preparados se incubaron a 37°C por 48 horas para favorecer el secado del bálsamo.

2.9.2.5 Visualización de los preparados y captura de imágenes

La primera visualización de los preparados se realizó en microscopio óptico (Zeiss, Alemania) a 3.2X, 10X y 40X. Se compararon las imágenes de los cortes de plantas sanas y los cortes de plantas enfermas para identificar patrones de tinción diferencial sobre el floema. La captura de imágenes se hizo en microscopio confocal (Nikon Eclipse Ti) a 10X, 20X y 40X, empleando el mismo en campo claro.

2.9.3 Tinción doble de los preparados con safranina/fast Green

Dado que los fitoplasmas tiene una ubicación restringida al floema (elementos cribosos), poder identificar estructuras floemáticas en los diversos tejidos analizados

resulta de vital importancia ya que distinguiendo a estos podemos determinar si la reacción de nuestro suero se correlaciona con el hábitat común de estos patógenos. Es por ello que se eligió una técnica de tinción rápida y sencilla para realizar coloraciones a los preparados, las cuales tiñen de manera diferencial el floema. Mientras que la safranina permite visualizar en rojo núcleo y estructuras lignificadas (xilema), el fast-green tiñe de celeste verdoso los tejidos con paredes no lignificadas y el citoplasma (floema, entre otros). De esta manera la doble coloración podrá permitir distinguir las estructuras floemáticas del resto de las estructuras.

2.9.3.1 Desparafinado e hidratación

Los preparados obtenidos en 2.6.1.4 se desparafinaron en solución de xilol 100% durante 2 horas a temperatura ambiente. Se los hidrato en etanol 100% y etanol 97% durante 10 minutos en cada uno a temperatura ambiente.

2.9.3.2 Tinción doble

Luego de la hidratación se colocaron los preparados en safranina al 1% durante 3-4 horas, se lavaron luego con alcohol 97% e inmediatamente se los tiñó con fast-green durante 1 minuto a temperatura ambiente. Por último, se lavaron los preparados en alcohol 100% durante 5 minutos y se montaron al igual que para inmunohistoquímica. Para la visualización y la toma de imágenes se procedió de la misma manera que para la técnica de inmunohistoquímica

3. Resultados

3.1 Clonado y secuenciación de un fragmento de 840pb de la proteína secA

Se logró amplificar un fragmento de 840pb a partir de ADN total de paraíso infectado con el fitoplasma ChTYXIII (aislamiento Montecarlo). No se observaron amplificaciones en ninguno de los controles negativos de reacción. El fragmento fue clonado exitosamente en el vector pBluescript SK II (+) y se secuenciaron dos clones clon transformante desde ambos extremos (M13-fwd/M13-rev). Se obtuvo una secuencia final de 831pb, la cual fue comparada con otras secuencias depositadas en banco de datos (NCBI) mediante BLASTn con los parámetros pre-establecido. El mayor valor de similitud (95%, e-value = 0) se encontró con la secuencia del gen SecA

del fitoplasma MPV (grupo 16SrXIII-A) (EU168753), seguido por la secuencia de dos fitoplasmas del grupo 16SrXII, el Strawberry lethal yellows phytoplasma (85%, e-value = 0) (CP002548) y el “*Candidatus* Phytoplasma australiense” (85%, e-value = 0) (AM42201). El análisis filogenético de la secuencia parcial del gen *secA* para el fitoplasma *China tree yellows* se realizó en el capítulo VI.

3.2 Analisis de la secuencia

Se determinó que el marco abierto de lectura del fragmento clonado de la proteína *secA* (831pb) se corresponde con el 3er nucleótido de la cadena complementaria (-3 frame). La secuencia aminoacídica resultante consta de 276aa con un peso molecular estimado de 31,63 kDa. Dicha secuencia presenta un valor de hidrofobicidad promedio de -0,3670 (valores negativos indican menor hidrofobicidad es decir que dichos residuos de aa tienen una mayor afinidad por el H₂O) (SOSUI program) y localización subcelular citoplásmica con un valor de score=9,97 (se consideran valores de score fiables los mayores a 7,5) asignada por el programa PSORTb v 3.0 (Yu et al., 2010). Este bajo valor de hidrofobicidad guarda relación con el perfil antigénico arrojado por el programa Protean (DNASTAR ver. 4.0) (Figura 4.3) en el que gran parte de la secuencia presenta altos índices de antigenicidad. Estos resultados demuestran a priori que la región elegida es un buen candidato para la inmunodetección específica del fitoplasma ChTYXIII.

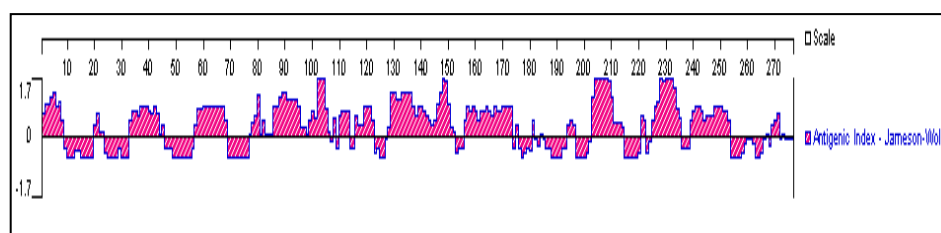


Figura 4.3: Perfil antigénico generado a partir del programa Protean del ORF-*secA*, los picos por encima de 0 representan porciones con mayor capacidad antigénica.

Por otro lado, empleando el sitio para la búsqueda de dominios conservados del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) se logró identificar 2 dominios conservados (Figura 4.4), i) **DEAD-like helicases superfamily domain** (residuos 1 a 116) (en azul) (e-value = 2.81e-04), relacionado con el transporte de una amplia variedad de compuestos tales como azúcares, iones, péptidos y moléculas

orgánicas complejas. Dentro de este dominio se detectó un sitio de unión a ATP (residuos GEGKT, posición 4-8) y un sitio putativo de unión a Mg^{++} (residuos DEVD, posición 110-113). Por otra parte, el 2do dominio conservado ii) **SecA preprotein cross-linking domain** (residuos 135-240) (en rosa) (evalue = $4.59e-5$) estaría relacionado con la unión a pre-proteínas.

3.3 Expresión de la proteína recombinante en un sistema procariota

3.3.1 Clonado en fase en el vector de expresión pET 30 a (+)

El ORF-secA fue liberado de pBluescript SK II (+) mediante doble digestión con las enzimas *EcoRI-NotI*, fue clonado en fase en el plásmido pET 30 a (+) y se logró transformar cepas de *E. coli* DH5 α . Se seleccionaron 3 clones transformantes (secA-C1, secA-C2 y secA-C3), los cuales fueron evaluados mediante PCR de colonia y por liberación de inserto. Se purificó el ADN plasmídico de cada uno de estos clones transformantes seleccionados mediante columnas (QIAGEN, Alemania) y se mantuvieron a $-20^{\circ}C$ hasta su posterior utilización para la transformación de *E. coli* BL21 (DE3). Cada clon fue secuenciado desde uno de sus extremos (M13Fw) y se comprobó la presencia del ORF secA.

3.3.2 Expresión del ORF secA en *E. coli* BL21 (DE3)

Se logró producir la proteína recombinante (ORF-secA, ~38kDa) en los 3 clones evaluados y en todos los tiempos ensayados (1, 3, 6 y 16 horas). No se observó la producción de proteínas de tamaño similar en los controles del vector de expresión pET 30a (+) original (con y sin inducción) ni en los clones pET 30a (+ (ORF-secA) sin inducir (Figura 4.5).

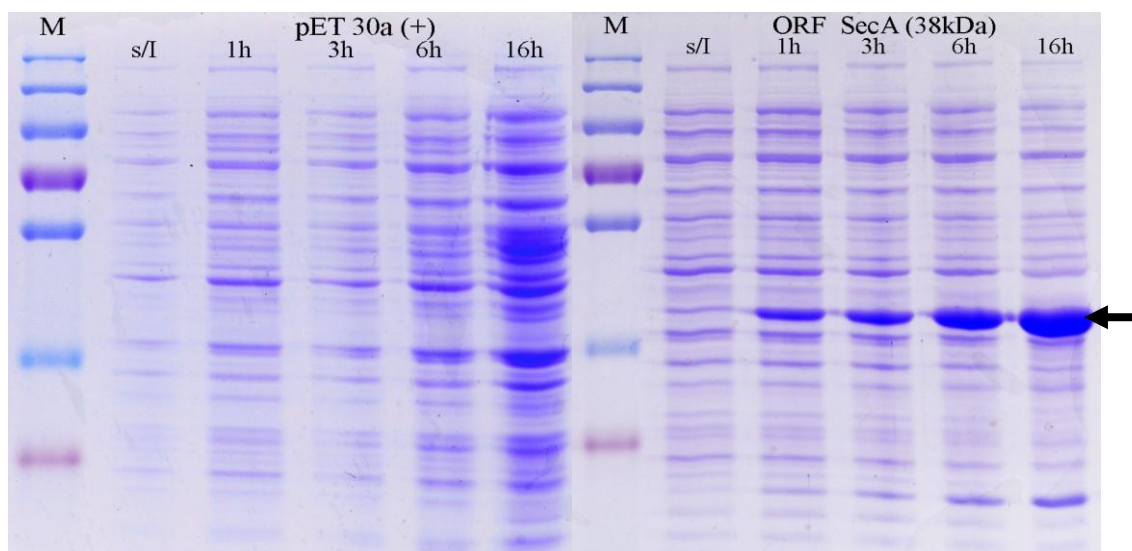


Figura 4.5: Inducción de la expresión de la proteína *secA* en *E. coli* BL21 (DE3). SDS-PAGE 12% teñido con Azul Brillante de Coomassie. pET30a (+)= plásmido vacío sin inducir (s/I) e inducido (1-3-6-16 hs); ORF-*secA* (~38kDa)= plásmido expresante de la proteína recombinante sin inducir (s/I) e inducido (1-3-6-16 hs) Y M=marcador de peso molecular preteñido (250, 130, 95, 72, 55, 36, 28 kDa; Fermentas, Lituania). La flecha indica la proteína recombinante del tamaño esperado (~38 kDa) expresada diferencialmente en cada uno de los tiempos empleados.

3.4 Purificación de la proteína recombinante: solubilización de cuerpos de inclusión y purificación mediante electroelución

De los 4 protocolos ensayados, el nº2, el cual incluye la utilización de Tritón X-100 en la resuspensión del pellet 1 (P1), es el que mejores resultados dió en lo que a solubilización de cuerpos de inclusión se refiere. Este protocolo fue el que menor cantidad de proteínas espurias presentó en el sobrenadante 3 (SN3) (Figura 4.6) respecto de los demás protocolos ensayados y fue seleccionado para la solubilización de la proteína recombinante. Esta se purificó a partir de geles SDS-PAGE al 12% mediante electroelución. Se realizaron 15 electroeluciones con un rendimiento promedio de 250ug/ μ l de proteína recombinante *secA* y 15mg en total. La proteína recombinante purificada se alicuotó y conservó a -20°C.

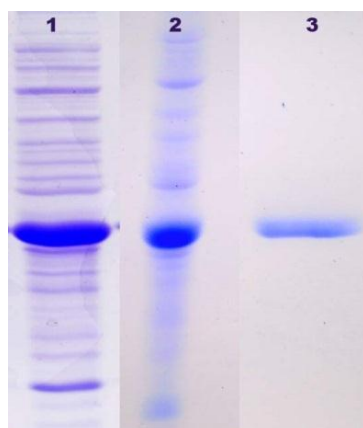


Figura 4.6: SDS-PAGE 12% teñido con Azul Brillante de Coomassie. **1:** Sobrenadante 3 (SN3) de la inducción cruda sin tratamiento, **2:** Sobrenadante 3 (SN3) obtenido mediante protocolo 2, **3:** Proteína *secA* purificada a partir de electroelución de gel.

3.5 Sensibilización de conejos con la proteína recombinante secA purificada

Se lograron recolectar aproximadamente 10ml de suero en cada una de las sangrías, los cuales fueron mantenidos a -20°C con 50% de glicerol estéril. El análisis de cada una de las sangrías mostró que los sueros con mejor comportamiento frente a la proteína recombinante son S6, S7, S8 y S9 tanto para la concentración de 50ng como para la de 500ng (proteína recombinante secA y lisado bacteriano). Estos mostraron fuerte reactividad frente a la proteína purificada y no así frente a lisado bacteriano (control negativo), como se puede observar en la Figura 4.7.

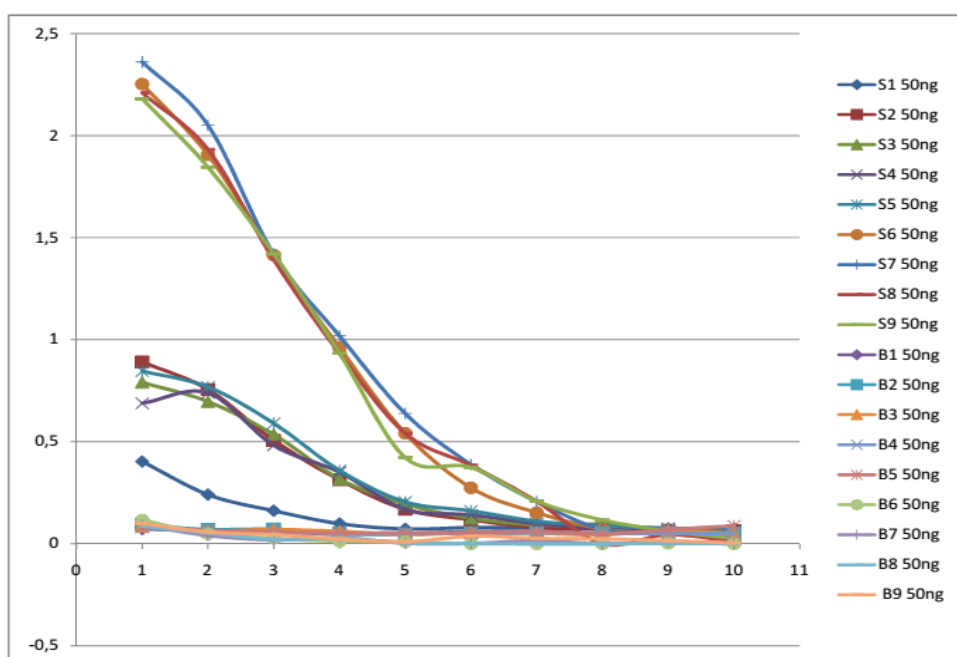


Figura 4.7: Comportamiento de las distintas sangrías frente a la proteína purificada (S 50ng) y lisado bacteriano (B 50ng) mediante la técnica PTA-ELISA para el tiempo 60 minutos. En el eje X se encuentran las distintas diluciones de los sueros empleadas (1= 1:1000, 2=1:2000, 3=1:4000,4= 1:8000,5=1:16000, 6=1:32000, 7=1:64000, 8=1:128000, 9=1:256000 y 10=1:5012000) y en el eje Y los valores de absorbancia obtenidos.

Cuando el suero se utiliza en altas concentraciones (1:1000-1:8000) el registro de absorbancia generado por estos sueros (A= 2,3 a 1,0) frente a la proteína secA purificada, fue de 10 a 200 veces mayor al valor adoptado contra la proteína de bacteria utilizada como control negativo, en la misma concentración y en el mismo tiempo de reacción. Se observó una excelente separación entre los valores de absorbancia para proteína purificada y bacteria hasta la dilución 1:16000. Esto demuestra que el suero generado presenta alta especificidad para la proteína secA, aunque el título es

relativamente bajo, ya que a diluciones mayores del suero, pierde capacidad reactiva frente a la proteína y no muestra un rango de discriminación adecuado con el control sano. Para los siguientes ensayos se empleó el suero S7.

3.6 Evaluación del suero S7 mediante NC-ELISA contra tejido de planta infectado

Tanto en vinca como en paraíso infectados se observaron reacciones colorimétricas muy suaves que no permitieron diferenciar tejido sano de tejido enfermo, en ninguna de las condiciones ensayadas (dilución tejido planta/dilución de suero), mientras que existió una intensa reacción contra proteína recombinante purificada, utilizada como control. Con la finalidad de intentar discriminar entre planta sana e infectada y mejorar la intensidad relativa de reacción se intentó eliminar la reactividad frente a proteínas de planta sana. Se procedió entonces a la adsorción del suero contra proteínas normales de planta. En este procedimiento se incubó el suero S7 crudo frente a proteína total de planta sana en buffer antisuero (TBS1X, leche descremada 2%) en una dilución 1/1000 durante 16 horas a 4°C. Se centrifugó a 5000rpm durante 5 minutos y se recuperó el sobrenadante. Para evaluar el efecto de la adsorción el mismo tejido enfermo volvió a evaluarse pero con suero sin adsorber. No se observaron reacciones colorimétricas diferenciales entre planta enferma vs planta sana, tanto para el suero adsorbido como para el suero s/adsorber. Estos resultados estarían demostrando que la proteína secA se encuentra en baja concentración en plantas infectadas, por lo tanto no es adecuado su empleo contra las proteínas SecAs en sistemas de diagnóstico masivo tales como ELISA, PTA-ELISA, NC-ELISA, entre otros.

3.7 Evaluación de la reactividad del suero S7 mediante inmunohistoquímica

3.7.1 Inmunolocalización de la proteína secA en cortes histológicos de paraíso infectado con el fitoplasma ChTYXIII

Se trabajó con paraísos propagados por semilla botánica en invernadero e infectados mediante injertos de púas. Antes de realizar los cortes a cada porción de tejido se constató la presencia de fitoplasmas mediante PCR (*primers* R16F2/R16R2). Se emplearon 3 plantas de paraíso infectadas con el fitoplasma ChTYXIII y dos plantas sanas. Mediante la tinción doble con safranina-fast green se determinó la localización

del tejido floemático y mediante inmunohistoquímica, utilizando el suero secA, la presencia de fitoplasmas en el mismo.

Se eligió tallo joven, ya que no presenta crecimiento secundario lo que facilita notablemente los procesos de inclusión, corte y tinción, y presenta proporcionalmente mayor cantidad de tejido floemático respecto a nervadura central de hoja. Mediante la técnica de doble tinción se logró determinar la ubicación del floema (Figura 4.8A y 4.8B) dado que se tiñe de color verde-violeta por presentar paredes no lignificadas. Esta coloración difiere claramente de la presentada por el xilema, ya que este por presentar paredes lignificadas, se tiñe de una coloración roja intensa. De esta forma se identificó al tejido floemático que se ubica inmediatamente por fuera del xilema formando un anillo y que se diferencia del parénquima por presentar una coloración más suave.

Una vez identificado el floema se procedió con la inmunolocalización de la proteína del fitoplasma mediante el uso del suero anti secA (S7). En la figura 4.8C se observa que en el tallo infectado la coloración azul-violeta se ubica diferencialmente sobre el floema y no sobre otro tejido. Por su parte en el tallo sano se visualizan puntos coloreados que responden a reacciones inespecíficas o deposición del sustrato sobre esas zonas por artificio de la técnica, destacándose que la coloración en el tallo sano es de mucha menor intensidad que en el tallo infectado.

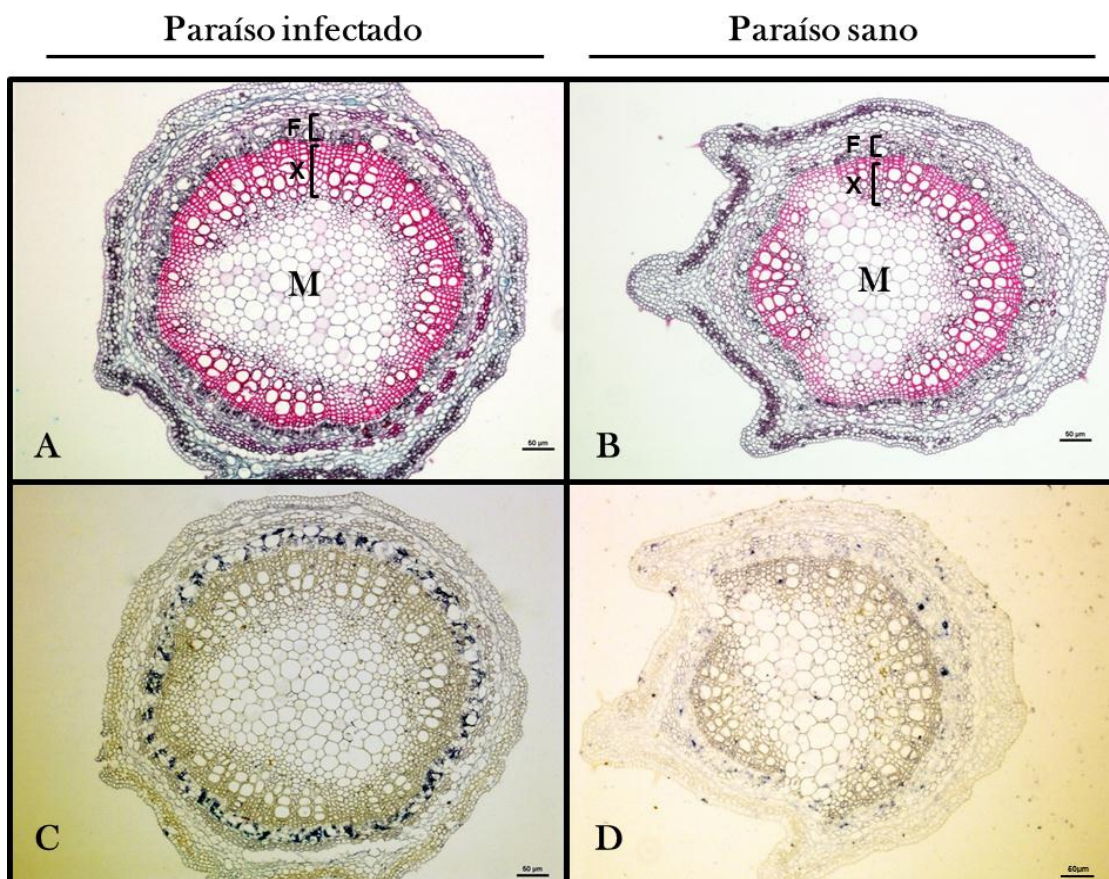


Figura 4.8: Doble coloración safranina/fast-green y detección inmunohistoquímica de la proteína *secA* en cortes de tallo joven de planta de paraíso enferma con el fitoplasma ChTYXIII; aumento 10X. A y C: corte transversal por tallo joven de paraíso infectado con el fitoplasma ChTYXIII, teñido con doble coloración (A) e inmunolocalización de la proteína *secA* (C); B y D: corte de tallo joven de paraíso sano, teñido con doble coloración (B) e inmunolocalización proteína *secA* (D). La coloración azul-violeta indica de la ubicación de la proteína *secA* en C. Barra de escala = 50µm; X: xilema, F: floema y M: médula.

En una magnificación de 40X se observa con mayor detalle la coloración azul-violeta sobre el tejido floemático (figura 4.9C). Estos resultados estarían demostrando que el antisuero policlonal anti-*secA* de fitoplasmas, reconoce de manera diferencial la proteína del patógeno en tallo de paraísos infectados y constituye una herramienta útil para realizar estudios de localización en tejidos de las plantas huésped, o insectos vectores.

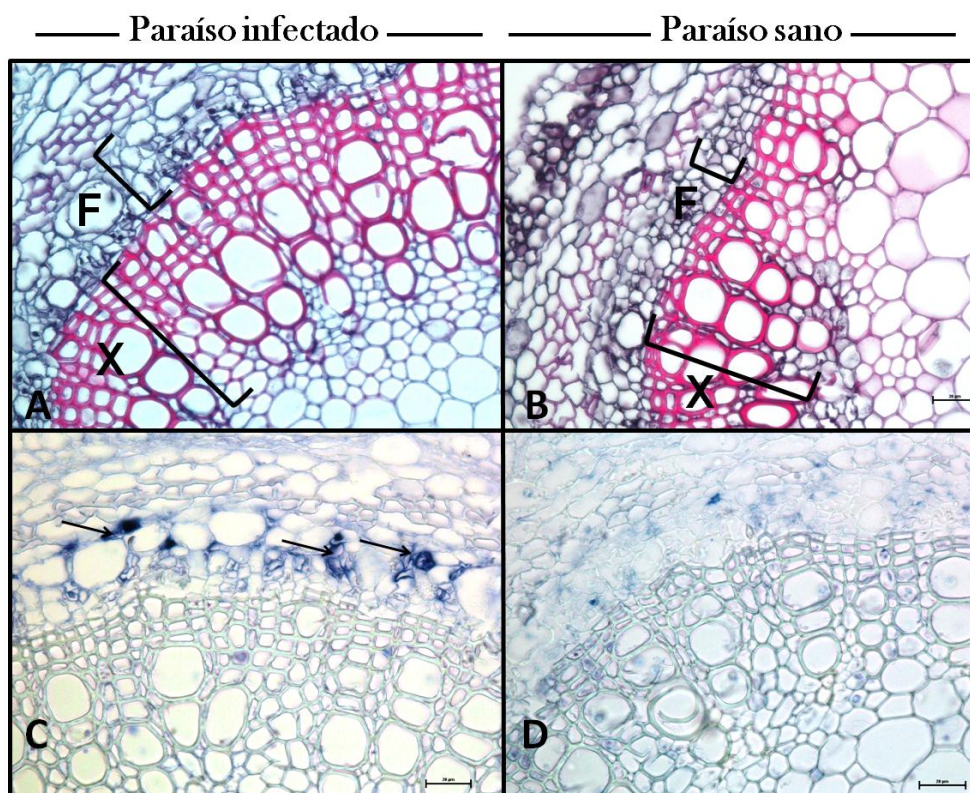


Figura 4.9: Doble coloración safranina/fast-green y detección inmunohistoquímica de la proteína *secA* en cortes de tallo joven de planta de paraíso enferma con el fitoplasma ChTYXIII; aumento 40X. A y C: corte transversal por tallo joven de paraíso infectado con el fitoplasma ChTYXIII, teñido con doble coloración (A) e inmunolocalización de la proteína *secA* (C); B y D: corte de tallo joven de paraíso sano, teñido con doble coloración (B) e inmunolocalización proteína *secA* (D). La coloración azul-violeta indica de la ubicación de la proteína *secA* en C. Barra de escala = 20µm; X: xilema, F: floema y M: médula.

3.7.2 Inmunolocalización de la proteína *secA* en cortes histológicos de vinca infectada con el fitoplasma ChTYXIII

Se trabajó con ejemplares de vinca infectados con el fitoplasma ChTYXIII propagados en invernadero mediante injertos. Antes de realizar los cortes a cada porción de tejido evaluada se controló por PCR para garantizar la presencia de infección (*primers* R16F2/R16R2). En este ensayo se emplearon 4 plantas de vinca infectadas y dos sanas. Se obtuvieron los cortes siguiendo el protocolo mencionado en la metodología y se evaluó mediante la tinción doble con safranina/fast-green la localización del tejido floemático y la presencia de fitoplasmas en el mismo mediante inmunohistoquímica utilizando el suero anti Sec-A.

———— Vinca infectada ———— ———— Vinca sana ————

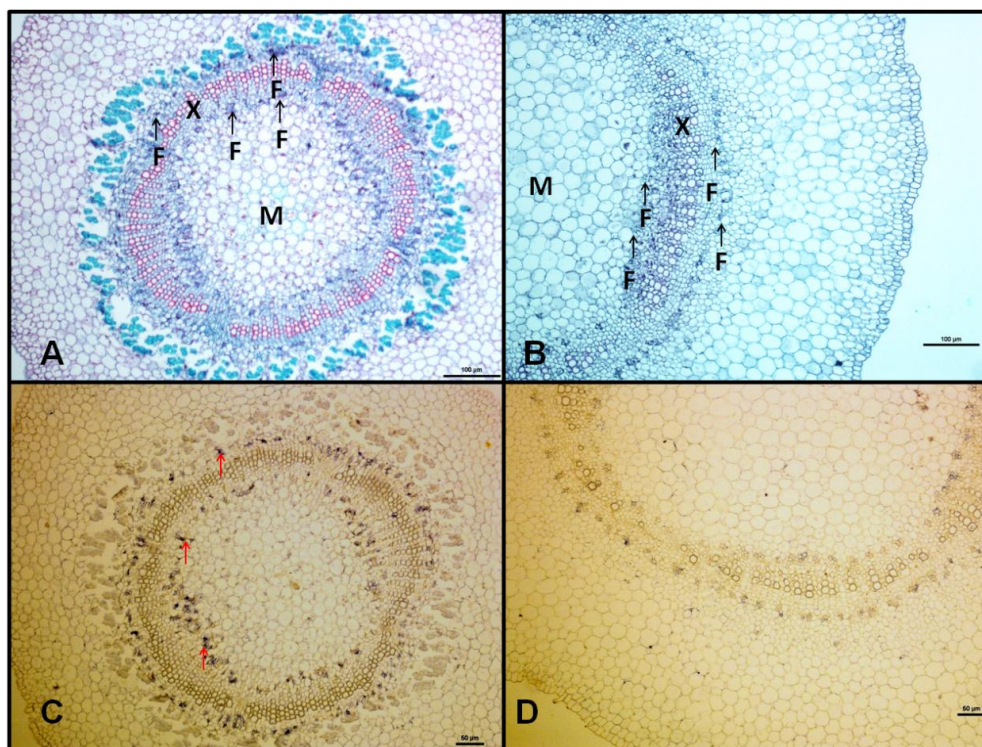


Figura 4.10: Doble coloración safranina/fast-green y detección inmunohistoquímica de la proteína secA en cortes de tallo joven de planta vinca enferma con el fitoplasma ChTYXIII; aumento 10X. A y C: corte transversal por tallo joven de vinca enferma con el fitoplasma ChTYXIII, teñida con doble coloración (A) e inmunolocalización de la proteína secA (C); B y D: corte de tallo joven de vinca sana, teñida con doble coloración (B) e inmunolocalización proteína secA (D). La coloración azul-violeta indica de la ubicación de la proteína secA en C. Barra de escala A-B= 100μm/C-D=50μm; X: xilema, F: floema y M: médula.

Los resultados obtenidos mediante la tinción doble con safranina/fast-green permitieron reconocer las estructuras floemáticas en el tallo de vinca. En este caso el floema está formado por pequeños grupos de células (coloración verde-violeta) que forman islas (no contiguas) inmediatamente en los bordes externos e internos del xilema. El xilema claramente se distingue por la presencia de células de paredes lignificadas teñidas de rojo formando un anillo continuo por fuera de la médula. No se observaron cambios estructurales entre los tallos enfermos y los sanos. Sin embargo, en el tallo enfermo por fuera del floema se detectaron células parenquimáticas con engrosamiento en sus paredes, posiblemente por acumulación de celulosa (coloración verdosa-celeste) las cuales pueden estar relacionada con la presencia de látex en los elementos de conducción, ya que vinca se caracteriza por producir esta clase de compuestos (Figura 4.10A y 4.10B).

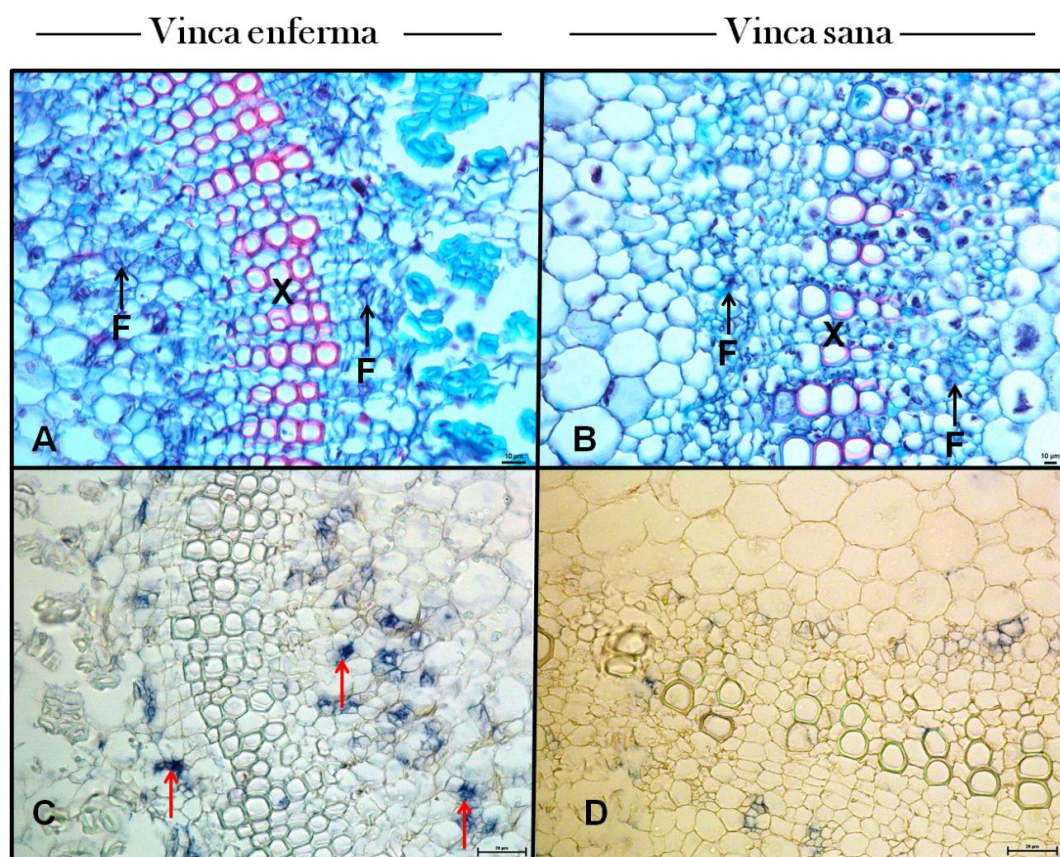


Figura 4.11: Doble coloración safranina/fast-green y detección inmunohistoquímica de la proteína *secA* en cortes de tallo joven de planta vinca enferma con el fitoplasma ChTYXIII; aumento 40X. A y C: corte transversal por tallo joven de vinca enferma con el fitoplasma ChTYXIII, teñida con doble coloración (A) e inmunolocalización de la proteína *secA* (C); B y D: corte de tallo joven de vinca sana, teñida con doble coloración (B) e inmunolocalización proteína *secA* (D). La coloración azul-violeta indica de la ubicación de la proteína *secA* en C. Barra de escala A-B = 10 μ m/C-D=20 μ m; X: xilema, F: floema y M: médula.

Respecto a la inmunomarcación de la proteína *secA*, se demostró que en tallos enfermos la misma se correspondía con la ubicación específica del floema, mientras que en tallos sanos existe alguna marcación inespecífica de escasa intensidad. A diferencia de lo detectado en paraíso, la intensidad de la coloración dada por la marcación de la proteína *secA* en vinca resulta algo menor, quizá debido a la distribución discontinua del tejido floemático o bien a que en esta especie hospedante el título de fitoplasmas es menor (Figura 4.10). En las imágenes tomadas con magnificación 40X se observa con mayor detalle la coloración azul-violeta de la proteína *secA* en los grupos de células floemáticas y no en otros tejidos (Figura 4.11 C).

4. Discusión

En el presente Capítulo se detalla cómo se logró inducir, en un sistema bacteriano, un fragmento interno de la proteína *secA* del fitoplasma *China tree yellows* (16SrXIII-C). Luego de ser purificada, la proteína recombinante producida (~38kDa) fue empleada en la inmunización de conejos para la obtención un antisuero policlonal, el cual fue capaz de reconocer, mediante inmunohistoquímica, de manera específica la proteína *secA* del fitoplasma ChTYXIII en tejidos de paraíso y vinca infectados. En este trabajo, tanto en paraíso (hospedante natural) como en vinca (hospedante experimental), las señales (coloración específica) han sido siempre registradas en el floema de los ejemplares infectados y no en los sanos. Esta localización específica de las señales colorimétricas, se corresponden con el habitat natural de los fitoplasmas en la planta (Christensen et al., 2005) y demuestran la especificidad del suero en el reconocimiento del fitoplasma ChTYXIII. El empleo de sueros generados en contra de la proteína *secA*, sumados al sistema de detección mediado por la fosfatasa alcalina ha demostrado presentar gran sensibilidad, resolución fina, bajos niveles de reacción inespecífica y estabilidad en la reacción (Kakizawa et al., 2001). En vinca, la intensidad de la coloración siempre fue menor, esto quizás pueda deberse a la presencia de un menor título de fitoplasmas en el tejido ya que se trata de un hospedante experimental, o bien por la degradación de las proteínas de fitoplasmas como parte de una respuesta de defensa de la planta, lo cual ya ha sido sugerido con anterioridad (Wei et al., 2004). Wei y col. (2004) emplearon un anticuerpo en contra de la proteína *secA* del fitoplasma OY-M (grupo 16SrI) (Kakisawa et al., 2001), que permitió reconocer no solo a este último sino además a fitoplasmas de los grupos 16SrIII (X-disease group), 16SrV (Elm yellows group) y 16SrXI (Rice yellow dwarf group). En nuestro caso particular no se ha enfrentado el suero anti *secA* contra otros fitoplasmas de distinto subgrupo 16Sr, sin embargo podemos esperar que se comporte de modo similar que el generado por Kakizawa y col. (2001), dado que fue generado en contra de la misma región. Dada la naturaleza conservada de la secuencia aminoacídica de la proteína *secA*, este antisuero podría ser una herramienta muy útil para estudios sobre dinámica de infección y es posible emplear el mismo en la inmunolocalización de fitoplasmas de

otros grupos 16Sr, presentes en nuestro país infectando innumerables especies nativas y cultivos de importancia económica.

En este trabajo también se evaluó la capacidad del suero para detectar fitoplasmas mediante la técnica de NC-ELISA en plantas infectadas. Nuestros resultados demostraron que no pudo diferenciarse entre el tejido sano y el enfermo, ya sea en paraíso como en vinca, ya que las reacciones colorimétricas siempre fueron homogéneas y con valores extremadamente bajos. Esto quizás pueda deberse al hecho de que la proteína *secA* se expresa en niveles muy bajos como para permitir diferenciar tejido sano del enfermo con un suero policlonal. Hodgetts y col. (2014) desarrollaron una serie de anticuerpos monoclonales en contra de la misma región de la proteína *secA* del fitoplasma *Cape St. Paul Wilt Disease* (grupo 16SrXXII). Los anticuerpos monoclonales generados fueron evaluados en primera instancia mediante Western Blot lográndose detectar bandas específicas de la proteína *secA* en material infectado, mientras que cuando se empleó la técnica de PTA-ELISA no pudieron diferenciar entre el material sano del enfermo. Los autores sugieren que la falla en la detección mediante PTA-ELISA puede deberse al hecho de que la proteína *secA* no se expresa en niveles suficientes para ser detectada o bien porque esta sufre cambios del tipo conformacional que afectan la capacidad de reconocimiento del suero por la misma.

El antisuero generado resultó ser una herramienta muy útil para estudios de localización del patógeno, lo cual permitiría no solo la detección del fitoplasma ChTYXIII en otros hospedantes aún no descubiertos, sino también realizar estudios acerca de la ubicación del fitoplasma ChTYXIII en diferentes estadios de infección. Además permitirá comprender de mejor manera los cambios histológicos producidos por el patógeno. Por otra parte se podrían iniciar estudios de localización del patógeno en insectos para establecer que tejidos funcionan como barreras y que en definitiva pueden determinar la capacidad de ser vectores de cada grupo de fitoplasmas.

Capítulo V

Caracterización molecular de fitoplasmas asociados al patosistema *EL* de frutilla en Argentina

1. Introducción

Argentina es uno de los pocos países del hemisferio sur con condiciones climáticas favorables para la producción de plantines de frutilla (*Fragaria x ananassa* Duch.) de alta calidad. Las áreas de producción de frutilla en nuestro país ocupan un amplio rango de latitudes (24°S - 42°S), siendo las principales provincias productoras Tucumán, Santa Fe, Buenos Aires y Corrientes (Kirschbaum et al., 2000). Anualmente se producen alrededor de 100 millones de plantines frescos y conservados en frío, tanto para el mercado interno como el externo (Kirschbaum et al., 2012). Según datos de la FAO durante el 2013 se cultivaron alrededor de 1000ha de frutilla en la Argentina, donde la participación de Tucumán fue de 340ha principalmente ubicadas en la localidad de Lules (Informe INTA, 2014). En lo que a exportación de fruta se refiere, esta provincia aportó 1.542 toneladas (36% del total) por un valor cercano a los U\$S 3.1 millones (Reporte Agroindustrial, 2014). La demanda interna de plantines de frutilla se ve suplida mediante la producción de viveros ubicados en localidades de la región sur de nuestro país, tales como Trevelín, Esquel y El Maitén (Chubut), en los Antiguos (Santa Cruz), Plottier (Neuquén), y como excepción de los viveros ubicados en Tafí del Valle (Tucumán). Los viveros de nuestro país importan plantas madres, principalmente de Estados Unidos y España (como plantas frigo) las cuales son reproducidas agámicamente mediante estolones. Por último los plantines se comercializan a los productores en función a la demanda y las condiciones de cultivo de cada zona (Molina et al., 2007). Dado que las frutillas se propagan vegetativamente (reproducción agámica) están sujetas a la infección y propagación de diversos tipos de patógenos entre los que se cuentan virus, de los que se conocen al menos 20 especies distintas afectando este cultivo (Martin y Tzanetakis, 2006). En lo que se refiere a bacterias, aquellas de ubicación restringida al floema, tales como el “*Candidatus Phlomobacter fragariae*” y los fitoplasmas, han sido reportados en todo el mundo afectando a la frutilla (Mass et al., 1998). El “*Ca. Phlomobacter fragariae*” es una de los agentes causales de la clorosis marginal de la frutilla, la cual ha ocasionado cuantiosas pérdidas en los cultivos de Francia (Danet et al., 2003). Por otro lado, se conoce muy bien que la planta de frutilla sirve como hospedante natural de diversos grupos de fitoplasmas filogenéticamente distintos (16SrI, 16SrIII, 16SrVI, 16SrVII, 16SrXII and 16SrXIII) (Harrison et al., 1997; Jomantiene et al., 1998, 1999, 2001; Padovan et al., 2000; Fernández et al.,

2013b). Las plantas de frutilla afectadas por estos patógenos exhiben síntomas tales como virescencia, filodia en flores y frutos, enanismo, superbrotamiento, cambios de coloración en hojas, deformación en flores y frutos.

En Argentina, Fernández y col. (2008a,b) describieron la presencia de fitoplasmas afectando lotes de frutilla en la región de Lules (Tucumán) por primera vez. La enfermedad conocida como *enrojecimiento letal* (EL) (anteriormente denominada “*plantas mariconas*”) se manifiesta con un achaparramiento generalizado de la planta, presencia de hojas maduras acartuchadas y enrojecimiento en su cara abaxial, hojas jóvenes con disminución de tamaño y coloración amarillenta hacia los bordes, deformación en flores y frutos y necrosis seguida de muerte. El análisis de los patrones PCR-RFLP (gen 16S rDNA) del fitoplasma asociado permitió clasificarlo como miembro del grupo 16SrXIII (Mexican periwinkle virescence group), y debido a sus diferencias como posible nuevo subgrupo. En el Capítulo II de la presente tesis, se describe la detección y caracterización de fitoplasmas asociados a la enfermedad de *enrojecimiento letal* mediante PCR y PCR-RFLP del gen 16S rDNA. En dicho Capítulo, se demostró a través del análisis de los patrones PCR-RFLP la presencia de fitoplasmas del grupo 16SrXIII, 16SrIII y 16SrVII asociados a la misma sintomatología. Dada esta situación y con el fin de establecer con precisión la clasificación de los fitoplasmas asociados al *EL* en frutilla, así como establecer las relaciones filogenéticas existentes entre ellos y con los demás fitoplasmas citados en el país y la región, se llevo a cabo la caracterización molecular de los fitoplasmas detectados.

Teniendo en cuenta que Argentina importa plantas madres que luego son multiplicadas bajo condiciones controladas, conocer la identidad y las relaciones filogenéticas de los fitoplasmas identificados con otros que afectan el cultivo, permitirá tener una idea más acabada del origen de los mismos y de cómo se comporta el patosistema en nuestra región. De esta manera, si los fitoplasmas hallados presentan una relación más cercana con especies descritas para la región, se podría hipotetizar sobre la presencia de posibles vectores que diseminan la enfermedad. Pero si los fitoplasmas identificados presentaran relaciones más estrechas con fitoplasmas de otras regiones, y en especial de regiones desde donde son originarias las plantas madre, entonces

podríamos inferir que la infección no se adquiere de manera local sino que estaría ingresando conjuntamente con el material importado.

Dado lo anteriormente expuesto se propone el siguiente objetivo específico:

Objetivo específico 4: Determinar la variabilidad intra e interespecífica en regiones genómicas conservadas de distintos aislamientos geográficos de los fitoplasmas *Strawberry Red Leaf* y *China tree yellows*, y realizar estudios filogenéticos utilizando las mismas.

2. Materiales y métodos

2.1 Obtención de aislamientos

Los aislamientos elegidos para la caracterización molecular del gen 16Sr DNA se obtuvieron a partir de dos fuentes:

Muestreo A: Muestras obtenidas en los muestreos preliminares (campañas 2009-2010): Durante los años 2009 y 2010 se muestrearon lotes de producción de frutilla en las localidades de Bella Vista (Pcia. Corrientes) y Lules (Pcia. Tucumán). Se recolectaron muestras (hojas y peciolas) con sintomatología de *EL*, los cuales fueron mantenidos a -20°C hasta su empleo. A su vez, se recolectaron plantas completas, las cuales fueron trasplantadas en invernadero y mantenidas en condiciones controladas de temperatura (25-30°C) y humedad, para su empleo no solo en la caracterización molecular del patógeno asociado sino también para la realización de ensayos de transmisión. La detección y caracterización de los fitoplasmas se llevó a cabo mediante PCR y PCR-RFLP según se describe en el Capítulo II.

Muestreo B: Muestras de frutilla PCR *nested* (PCRn) positivas (*primers* F2nR2) obtenidas en los muestreos de incidencia y prevalencia (Capítulo II), llevados a cabo en la localidad de Lules (Tucumán) (campañas 2010-2011-2012). El ADN total extraído de estas muestras se conservó a -20°C hasta su posterior utilización.

2.3 Clonado y secuenciación del gen 16Sr DNA

2.3.1 Ligación y transformación

Se seleccionaron 10 aislamientos (ADN de 10 plantas PCRn positivas, provenientes de los muestreos A y B) para el clonado y la secuenciación de una región parcial del gen 16Sr DNA. El producto de 1.2kb amplificado mediante la PCRn fue purificado utilizando columnas de IllustraMicrospin S-400 HR (GE, UK) de acuerdo a las condiciones del proveedor. Los productos purificados se evaluaron por electroforesis en gel de agarosa 1% con solución tampón TAE, teñido con bromuro de etidio y se observaron a través de luz UV. Para la ligación se empleó el kit comercial pGEM T-Easy system (Promega, USA) siguiendo las condiciones propuestas por el fabricante.

Los insertos fueron ligados al vector en una relación 3 (inserto):1 (plásmido) (60ng:50ng), e incubados durante 16 horas con 1U de T4 DNA Ligase a 4°C.

En la transformación se emplearon 50µl de células competentes de *E. coli* DH5α y 5-7µl del producto de ligación. Se llevó a cabo mediante shock térmico a 42°C durante 90" siguiendo protocolos previamente establecidos (Sambrook *et al.*, 1989). La recuperación de las bacterias se realizó en medio LB líquido (500µl) durante 45 minutos a 37°C y agitación continua (150rpm).

2.3.2 Selección de colonias transformantes

La selección de bacterias transformadas se constató por resistencia a ampicilina (gen de resistencia presente en el vector pGEM T-Easy). La identificación de las colonias portadoras de plásmidos recombinantes se hizo por el método de α -complementación del gen de la β -galactosidasa (*lacZ*). El cultivo bacteriano se sembró en cajas de Petri con medio LB sólido (1.5 % de agar) + 0,1 mg/ml de ampicilina + 0,4 mg/ml de IPTG (isopropiltiol- β -D-galactósido) + 40 µg/ml de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido), se incubaron en estufa a 37°C durante 16 h. Se seleccionaron las colonias de color blanco y se confirmó la presencia del inserto clonado por PCR directo de colonia empleando los cebadores pUC/M13-fwd y pUC/M13-rev los cuales presentan sitios de hibridación por fuera del sitio de clonado. Otro de los controles realizado fue la liberación del inserto mediante el uso de la enzima de restricción *EcoRI* (NEB, USA) a partir del ADN del plásmido purificado, por la presencia de sitios de cortes a cada lado del linker de clonado. Para cada uno de los aislamientos analizados se seleccionaron 3 clones transformantes para su secuenciación. Para la purificación del DNA plasmídico se emplearon dos tipos de columnas, las columnas QIAGEN-tip® 20 (Qiagen, USA) y las columnas NucleoSpin®Plasmid (MACHEREY-NAGEL, Germany) siguiendo las condiciones de los fabricantes.

2.3.3 Ensamblaje de las secuencias

El ADN plasmídico correspondiente a cada uno de los tres clones purificados fue secuenciado desde ambos extremos empleando los *primers* universales T7 y SP6. Las secuenciaciones se realizaron en la Unidad de Genómica dependiente del Instituto de

Biotecnología (CICVyA-INTA, Argentina) y en Macrogen (Korea). El ensamblaje de las secuencias se realizó empleando el software SeqMan (DNASTAR vers. 8, Lasergene software) y se realizaron ajustes manuales cuando fue necesario.

2.4 Análisis de las secuencias

2.4.1 Análisis de los patrones RFLP putativos y clasificación en grupos 16Sr

Se calcularon los coeficientes de similitud (F) derivados de los RFLPs basados en el análisis de los sitios de restricción putativos en las secuencias de 1,2 kb del ADNr 16S (limitadas por los sitios de hibridación de los oligonucleótidos R16F2n y R16R2) mediante la herramienta *iPhyClassifier* (<http://plantpathology.ba.ars.usda.gov/cgi-bin/resource/iphyclassifier.cgi>) (Zhao et al., 2009) disponible *online*. Este programa permite calcular el coeficiente de similitud RFLP o F siguiendo lo establecido por Nei y Li (1979), siendo $F = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$ donde x e y son cepas de dos fitoplasmas dados, N_x , N_y son el número de fragmentos resultantes de la digestión con las 17 enzimas antes mencionadas en la cepa x y la cepa y respectivamente, y N_{xy} es el número de fragmentos compartidos entre ambas cepas (Figura 5.1). Anteriormente se reconocía la presencia de nuevos subgrupos, dentro de un grupo 16Sr dado, si entre entre estos existía diferencias entre los patrones RFLP en al menos 1 enzima (Lee et al., 1998). Mas adelante, con el desarrollo de software específicos destinados a la comparación *in silico* de los patrones RFLP, se lograron establecer los valores de referencia para el coeficiente de similitud (F) para la diferenciación de los distintos subgrupos (Wei et al., 2007). De esta forma, los miembros de un mismo subgrupo presentarían valores de $F \geq 0.97$ (0.98 y 0.99 son considerados variantes del subgrupo). Es por ello que cada nuevo subgrupo es reconocido si este presenta valores de $F \leq 0.97$ respecto de las secuencias de referencias de los subgrupos descritos para un grupo 16Sr particular (Wei et al., 2007). Este criterio de clasificación fue empleado a la hora de determinar la pertenencia a los distintos subgrupos 16Sr de los aislamientos analizados.

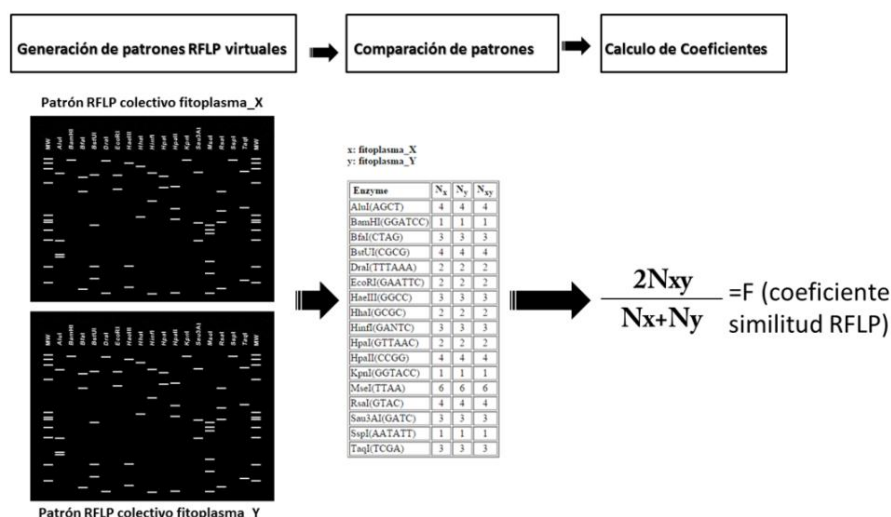


Figura 5.1: Esquema en el que se muestra el funcionamiento general del programa *iPhyClassifier* otorgar la clasificación 16Sr. El primer lugar al ingresar la secuencia (fragmento del gen 16Sr, *primers* R16F2n/R16R2) la misma es digerida putativamente por las 17 enzimas propuestas en el sistema de clasificación (Lee et al., 1998) generando un patrón RFLP colectivo. En segundo lugar, se compara los patrones generados con cada una de las enzimas, con los patrones de las secuencias depositadas en el banco de datos o aquellas ingresadas manualmente. Por último se procede con el cálculo del valor F (coeficiente de similitud RFLP) de acuerdo a la formula general.

Este programa además, cuenta con un banco de datos de secuencias de referencias para la gran parte de los subgrupos 16Sr descritos hasta el momento, aunque también permite incluir en el análisis secuencias que no estén presentes en dicho banco. A su vez se analizaron los patrones RFLP putativos de geles *in silico* para las enzimas que generan patrones diferenciales.

2.4.2 Análisis de la identidad nucleotídica

Se calculó la identidad nucleotídica de las secuencias del gen 16S ARNr de los fitoplasmas asociados al *enrojecimiento letal* de la frutilla. Se realizaron alineamientos múltiples por el método exhaustivo ClustalW con el programa MegAlign (DNASTAR vers. 8, Lasergene software). Los fitoplasmas incluidos en cada análisis dependieron de la clasificación generada a partir de los resultados de los patrones RFLP putativos y de las secuencias disponibles en el banco de datos GenBank.

2.4.3 Análisis filogenético

Para la construcción del árbol filogenético se emplearon las secuencias de los aislamientos secuenciados en esta tesis (10), secuencias de todos los "*Candidatus*

Phytoplasma species” descritos hasta el momento, y secuencias de miembros representativos de los grupos 16SrXIII, 16SrIII y 16SrVII dependiendo del caso. La selección de las secuencias se basó en la clasificación preliminar generada mediante PCR-RFLP *in silico* descrita en 2.4.1. Las secuencias fueron alineadas mediante CLUSTAL W empleando el software MEGA6 (Tamura et al., 2013). Se limpiaron los extremos de los alineamientos, para garantizar cobertura total a lo largo del mismo, en cada una de las secuencias. Se determinó el mejor modelo de sustitución nucleotídica, analizando los alineamientos mediante el software jModelTest 2.1.6 (Darriba et al., 2012). Una vez seleccionado este, y sus respectivos parámetros, se construyeron los árboles filogenéticos empleando el método de Maximum-Likelihood utilizando el software disponible online PhyML 3.0 (<http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/>) (Guidon et al., 2010). Para otorgarle soporte estadístico a los clados generados se realizó un remuestreo mediante un bootstrap no paramétrico con 1000 réplicas. Los árboles resultantes fueron editados con el programa MEGA versión 6.

3. Resultados

3.1 Aislamientos secuenciados

Se logró secuenciar de manera exitosa el gen 16Sr DNA en los 10 aislamientos seleccionados de fitoplasmas asociados con la sintomatología de *Enrojecimiento Letal (EL)* en plantas de frutilla; 7 de ellos provenientes de la región de Lules y 3 de la región de Bella Vista (Tabla 5.1). Además de un aislamiento con síntoma de filodia, típico de fitoplasmosis obtenido en la localidad de Bella Vista (ASP).

Tabla 5.1: Aislamientos secuenciados, de fitoplasmas asociados al síntoma de EL en frutilla. a: aislamientos previamente caracterizados y resecuenciados en esta tesis; b: fitoplasma *Argentinean Strawberry Phylloxy*ASP. Los aislamientos están clasificados de acuerdo al patrón de PCR-RFLP mostrados por la digestión con la enzima *Mse I*.

| Aislamiento | Síntoma | Procedencia/Muestreo | Patrón <i>MseI</i> |
|---------------------|----------------------|-------------------------------------|--------------------|
| EL-Tc2 | Enrojecimiento letal | Lules (Tucumán) /muestreo-A | Grupo 16SrIII |
| EL-Tc4 | Enrojecimiento letal | Lules (Tucumán)/muestreo-A | Grupo 16SrIII |
| EL-Tc12 | Enrojecimiento letal | Lules (Tucumán)/muestreo-B | Grupo 16SrXIII |
| EL-Tc32 | Enrojecimiento letal | Lules (Tucumán)/muestreo-B | Grupo 16SrXIII |
| EL-Tc40 | Enrojecimiento letal | Lules (Tucumán)/ muestreo-B | Grupo 16SrXIII |
| EL-Tc53 | Enrojecimiento letal | Lules (Tucumán)/ muestreo-B | Grupo 16SrIII |
| EL-Tc75 | Enrojecimiento letal | Lules (Tucumán)/ muestreo-B | Grupo 16SrIII |
| EL-BV1 | Enrojecimiento letal | Bella Vista (Corrientes)/muestreo-A | Grupo 16SrXIII |
| EL-BV2 | Enrojecimiento letal | Bella Vista (Corrientes)/muestreo-A | Grupo 16SrXIII |
| EL-BV3 | Enrojecimiento letal | Bella Vista (Corrientes)/muestreo-A | Grupo 16SrVII |
| EL-Tc1 ^a | Enrojecimiento letal | Lules (Tucumán) | Grupo 16SrXIII |
| EL-Tc7 ^a | Enrojecimiento letal | Lules (Tucumán) | Grupo 16SrXIII |
| ASP ^b | Filodia | Bella Vista (Corrientes)/muestreo-A | Grupo 16SrVII |

3.2 Análisis de las secuencias

Dado que los aislamientos pertenecen a distintos grupos 16Sr (según el patrón RFLP de la enzima *MseI*), se consideró conveniente analizar a los distintos aislamientos en función de esta clasificación, de modo que los aislamientos EL-Tc1, EL-Tc7, EL-Tc12, EL-Tc32, EL-Tc40, EL-BV1 y EL-BV2 han sido comparados y analizados con representantes del grupo 16SrXIII. Por su parte los aislamientos EL-Tc2, EL-Tc4, EL-Tc53 y EL-Tc75 fueron comparados y analizados con aquellos miembros pertenecientes al grupo 16SrIII, mientras que los aislamientos EL-BV3 y ASP fueron comparados y analizados con representantes del grupo 16SrVII. El listado de secuencias empleadas para cada caso se detalla en Anexo (Tabla 2).

3.2.1 Fitoplasmas asociados al grupo 16SrXIII

- Identidad nucleotídica

En función a los valores de similitud hallados podemos dividir a los aislamientos 16SrXIII en dos grupos:

i) comprendido por los aislamientos EL-Tc1, EL-Tc7, EL-BV1 y EL-BV2, cuyos valores de identidad entre ellos varió entre 99.45-100%, mientras que respecto de los fitoplasmas del grupo 16SrXIII los mayores valores de identidad (98.46-99.41%) se dieron con los fitoplasmas SFPBr2/SFPBr3, los cuales han sido detectados en el cultivo de frutilla en Brasil (ver Anexo Tabla 4).

ii) comprendido por los aislamientos EL-Tc12, EL-Tc32 y EL-Tc40, que presentaron valores de identidad entre ellos de 99.52-99.76%, mientras que respecto a los fitoplasmas del grupo 16SrXIII los mayores valores de identidad (99.42-99.50%) se dieron con el fitoplasma MPV (ver Anexo Tabla 4).

Los valores de identidad nucleotídica entre los grupos i y ii varió entre 97.58 y 98.32% (ver Anexo Tabla 3)

- Análisis de los patrones RFLP *in silico*

Se calcularon los valores de F (índice de similitud RFLP) para cada uno de los aislamientos comparándolos con la secuencia de referencia de cada uno de los subgrupos del grupo 16SrXIII (Tabla 5.2). Los aislamientos del grupo i) (EL-Tc1, EL-Tc7, EL-BV1 y EL-BV2) presentaron *in silico* un patrón idéntico ($F=1$) entre ellos para cada una de las 17 enzimas ensayadas, el cual se correspondió con los patrones observados en laboratorio. Respecto de la comparación con el fitoplasma patrón de cada uno de los sub-grupos del grupo 16SrXIII, el perfil de RFLP de mayor similitud a dichos aislamientos es el del fitoplasma MPV (Mexican periwinkle virescence) (16SrXIII-A) con un valor de $F=0.89$. Este valor estaría indicando que dichos aislamientos pertenecerían al grupo 16SrXIII, pero a un nuevo subgrupo, ya que como se describiera con anterioridad el valor de F es menor a 0,97, por lo que se los propone tentativamente como integrantes del nuevo subgrupo 16SrXIII-F. Se identificaron 4 enzimas de restricción (*KpnI*, *AluI*, *RsaI* y *HaeIII*) cuyo patrón difiere claramente con el de todos los subgrupos del grupo 16SrXIII hasta el momento descritos (Figura 5.2). Cuando se comparo el patrón característico de este nuevo subgrupo respecto de los

patrones de los fitoplasmas SFP-Br02 y SFP-Br03 (descritos en frutilla en Brasil) los valores de F encontrados fueron 0.94 y 1, respectivamente. Estos valores estarían indicando que el aislamiento SFP-Br02 se trataría de un nuevo subgrupo, mientras que el aislamiento SFP-Br03 pertenecería al nuevo subgrupo descrito en esta tesis, conjuntamente con los aislamientos EL-Tc1, EL-Tc7, EL-BV1 y EL-BV2. Respecto a al grupo ii, los aislamientos EL-Tc12 y EL-Tc32 pertenecen al subgrupo 16SrXIII-A, ya que el aislamiento EL-Tc12 es 100% idéntico en el patrón RFLP (F=1), mientras que el aislamiento EL-Tc32 presenta un patrón diferencial con la enzima *AluI* por lo que da un valor de F=0.98 respecto del fitoplasma MPV. Por su parte el aislamiento EL-Tc40 muestra diferencias en dos enzimas, *AluI* y *HpaII* (Figura 5.3) y un valor de F=0.95 respecto del subgrupo 16SrXIII-A, por lo que presenta un patrón RFLP distinto al de todos los subgrupos descritos hasta el momento del grupo 16SrXIII, pudiendo ser considerado tentativamente como un nuevo subgrupo.

La clasificación propuesta para estos aislamientos, se correlaciona con los resultados obtenidos en el análisis de la identidad nucleotídica. Los aislamientos EL-Tc1, EL-Tc7, EL-BV1 y EL-BV2 presentaron los mayores valores de identidad respecto a los fitoplasmas SFP-Br02/SFP-Br03, mientras que los aislamientos EL-Tc12, EL-Tc32 y EL-Tc40 presentaron los mayores valores de identidad respecto al subgrupo 16SrXIII-A.

Tabla 5.2: Índices de similitud (F) de cada uno de los aislamientos de fitoplasmas asociados al enrojecimiento letal en frutilla y la cepa de referencia de cada uno de los subgrupos del grupo 16SrXIII. 1: fitoplasma MPV (AF248960); 2: fitoplasma STRAWB1 (U96614); 3: fitoplasma CbY1 (AF495882); 4: fitoplasma SINPV (FJ914647) y 5: fitoplasma PACN-Br01 (JX893519).

| Aislamiento/cepa referencia | 16SrXIII-A ¹ | 16SrXIII-B ² | 16SrXIII-C ³ | 16SrXIII-D ⁴ | 16SrXIII-E ⁵ |
|-----------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| EL-Tc1 | 0.89 | 0.82 | 0.70 | 0.82 | 0.82 |
| EL -Tc7 | 0.89 | 0.82 | 0.70 | 0.82 | 0.82 |
| EL -BV1 | 0.89 | 0.82 | 0.70 | 0.82 | 0.82 |
| EL -BV2 | 0.89 | 0.82 | 0.70 | 0.82 | 0.82 |
| EL - Tc12 | 1.00 | 0.93 | 0.81 | 0.93 | 0.92 |
| EL -Tc32 | 0.98 | 0.91 | 0.79 | 0.91 | 0.90 |
| EL -Tc40 | 0.95 | 0.88 | 0.76 | 0.88 | 0.87 |

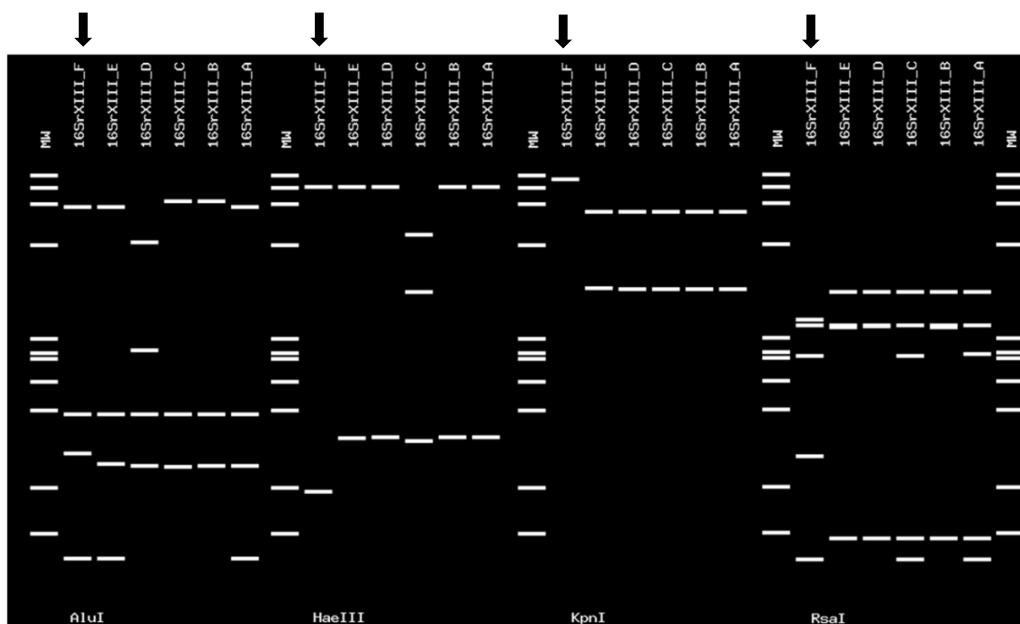


Figura 5.2: Patrones RFLP *in silico* generados a partir de la secuencia parcial del gen 16S (1.2kb, *primers* R16F2n/R16R2), se muestran los patrones generados por las 4 enzimas que generan un patrón diferencial del nuevo subgrupo XIII-F. 16SrXIII-A: fitoplasma MPV (AF248960); 16SrXIII-B: fitoplasma STRAWB1 (U96614); 16SrXIII-C: fitoplasma CbY1 (AF495882); 16SrXIII-D: fitoplasma SINPV (FJ914647) y 16SrXIII-E: fitoplasma PACN-Br01 (JX893519), MW: marcador de peso molecular: Φ 174-*HaeIII*. Las flechas indican el patrón del nuevo subgrupo 16SrXIII-F.

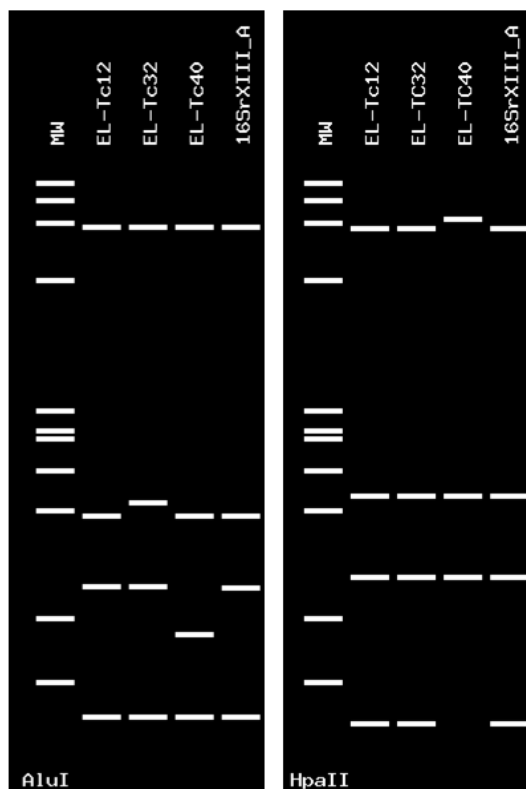


Figura 5.3: Patrones RFLP *in silico* generados a partir de la secuencia parcial del gen 16S (1.2kb, *primers* R16F2n/R16R2) de los aislamientos relacionados al subgrupo 16SrXIII-A. 16SrXIII-A: fitoplasma MPV (AF248960), MW: marcador de peso molecular: Φ 174-*HaeIII*.

3.2.2 Fitoplasmas asociados al grupo 16SrIII

- Análisis de la identidad nucleotídica

Los valores de identidad hallados entre los aislamientos EL-Tc2, EL-Tc4, EL-Tc53 y EL-Tc75 variaron entre 97.35% y 98.39% (ver tabla Anexo 5). Los aislamientos EL-Tc2 y EL-Tc4 mostraron los mayores valores de similitud con los fitoplasmas TomRed y CucVir (entre 98.60 y 99.20%) ambos del subgrupo 16SrIII-J, los cuales fueron detectados en Argentina afectando tomate (*Solanum lycopersicum*) y zapallito (*Curcubita máxima*), respectivamente (Galdeano et al., 2013). Por su parte los aislamientos EL-Tc53 y EL-Tc75 mostraron tener mayor similitud (entre 99.28 y 99.44%) con los fitoplasmas ConWB-A/ConWB-B (16SrIII-X) y HetLL (16SrIII-W) los cuales han sido detectados en Argentina afectando rama negra (*Conyza bonaeriensis*) y romerillo (*Heterothalamu salienus*), respectivamente (Galdeano et al., 2013) (ver tabla Anexo Tabla 5).

- Análisis de los patrones RFLP *in silico*

El aislamiento EL-Tc4, presentó un valor de $F=0.98$ respecto a la cepa de referencia para el subgrupo 16SrIII-J, encontrándose diferencias en el patrón generado por la enzima *HinfI* (Figura 5.4). Este resultado demuestra entonces que dicho aislamiento se trata de una variante del subgrupo 16SrIII-J. Por su parte el aislamiento EL-Tc2, presento un patrón RFLP diferente de todos los grupos/subgrupos 16Sr descritos hasta el momento. El patrón al que más se le asemeja es el del subgrupo 16SrIII-J, con un valor de $F=0.95$, diferenciándose de este por los perfiles de las enzimas *MseI* y *TaqI* (Figura 5.4). Dado esto, el aislamiento EL-Tc4 sería un nuevo subgrupo dentro del 16srIII, aún no descrito.

Por otro lado, los aislamientos EL-Tc53 y EL-Tc75 presentaron un patrón RFLP diferentes de todos los grupos/subgrupos 16Sr descritos hasta el momento. El patrón que mas se les asemeja es el del subgrupo 16SrIII-X, con un valor de $F=0.97$. El aislamiento EL-Tc53 se diferencia de la cepa patrón 16SrIII-J, por el perfil de la enzima *RsaI*, mientras que el aislamiento EL-Tc75 por el de la enzima *BfaI*, siendo estas dos enzimas las que diferencian entre si también, a estos dos aislamientos (Figura 5.4). Estre

estos dos aislamientos se halló un valor de $F=0.94$. Dados estos resultados, los aislamientos EL-Tc53 y EL-Tc75 serían considerados tentativamente como nuevos subgrupos aun no descritos, dentro del grupo 16SrIII.

La clasificación generada a partir de el análisis *in silico* de los patrones RFLP demostraron ser consistentes con los valores de identidad nucleotídica calculados. Para el caso de los aislamientos EL-Tc4 (16SrIII-J) y EL-Tc2 (tentativamente nuevo subgrupo 16SrIII), mostraron los mayores valores de identidad con representantes del subgrupo 16SrIII-J. Por su parte, los aislamientos EL-Tc53 y EL-Tc75 (ambos considerados tentativamente como nuevos subgrupos), mostraron los mayores valores de similitud con fitoplasmas representativos del grupo 16SrIII-X, con el que además presentan las mayores similitudes en cuanto a su patrón RFLP.

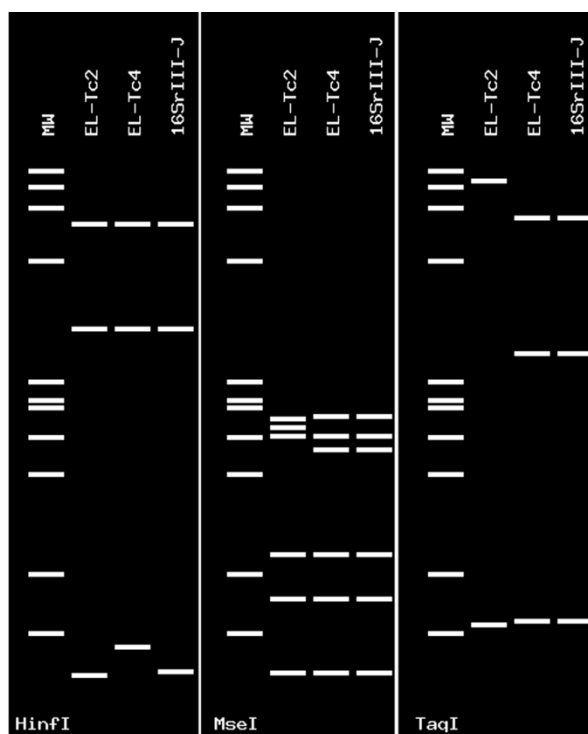


Figura 5.4: Patrones RFLP *in silico* generados a partir de la secuencia parcial del gen 16S (1.2kb, *primers* R16F2n/R16R2) de los aislamientos relacionados al subgrupo 16SrIII-J. Se muestran los patrones generados por las enzimas *HinfI*, *MseI* y *TaqI*. 16SrIII-J: patrón RFLP del aislamiento *Garlic decline*, EL-Tc2/EL-Tc4: aislamientos *EL*. MW: marcador de peso molecular: $\Phi 174$ -*HaeIII*.

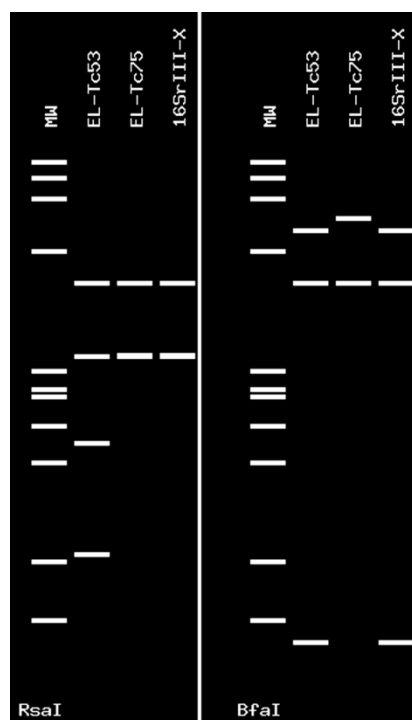


Figura 5.4: Patrones RFLP *in silico* generados a partir de la secuencia parcial del gen 16S (1.2kb, *primers* R16F2n/R16R2) de los aislamientos relacionados al subgrupo 16SrIII-X. Se muestran los patrones generados por las enzimas *RsaI* y *BfaI*. 16SrIII-X: patrón RFLP del aislamiento *Conyza witches' broom*, EL-Tc53/EL-Tc75: aislamientos *EL*. MW: marcador de peso molecular: Φ 174-*HaeIII*.

Tabla 5.3: Índices de similitud (F) de cada uno de los aislamientos de fitoplasmas asociados al enrojecimiento letal en frutilla y la cepa de referencia de algunos subgrupos del grupo 16SrIII.1: fitoplasma *China tree decline* ChTDIII (AY081817), 2: fitoplasma *Garlic decline* GDIII (AY081816), 3: fitoplasma *Conyza witches' broom* ConWB-A (KC412026) y 4: fitoplasma *Heterothalamus little leaf* HetLL (KC412029).

| Aislamiento/ cepa de referencia | 16SrIII-B ¹ | 16SrIII-J ² | 16SrIII-X ³ | 16SrIII-W ⁴ |
|---------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| EL-Tc53 | 0.96 | 0.93 | 0.97 | 0.94 |
| EL-Tc75 | 0.94 | 0.91 | 0.97 | 0.94 |
| EL-Tc2 | 0.92 | 0.95 | 0.88 | 0.85 |
| EL-Tc4 | 0.95 | 0.98 | 0.92 | 0.89 |

3.2.3 Fitoplasmas asociados al grupo 16SrVII

- Análisis de la identidad nucleotídica

Se calcularon los porcentajes de identidad nucleotídica de la secuencia del aislamiento EL-BV3 con aquellos fitoplasmas característicos del grupo 16SrVII (ver Anexo Tabla 6). Los mayores porcentajes de similitud se dieron con las secuencias de los fitoplasmas ArAWB (99.68%), ASP (99.20%) ambos pertenecientes al subgrupo

16SrVII-C, y previamente descritos en Argentina afectando alfalfa (*Medicago sativa*) y frutilla, respectivamente (Conci et al., 2005, Fernández et al., 2013b).

- **Análisis de los patrones RFLP *in silico***

El aislamiento EL-BV3 presentó un patrón RFLP diferente de todos los grupos/subgrupos 16Sr descritos hasta el momento. El patrón que mas se les asemeja es el del subgrupo 16SrVII-C, con un valor de $F=0.97$. Solo se encontró una diferencia en el patrón con la enzima *HinfI* (Figura 5.6) respecto de la secuencia patrón del subgrupo 16SrVII-C, mientras que para el resto de las enzimas los patrones fueron idénticos. Estos resultados demuestran que el aislamiento EL-BV3 sería tentativamente un nuevo subgrupo dentro del sgrupo 16SrVII.

EL análisis de los patrones RFLP *in silico* resultó ser congruente con los valores de identidad nucleotídica hallados, ya que em ambos casos el ailamiento EL-BV3 fue cercanamente relacionado con fitoplasmas del subgrupo 16SrVII-C

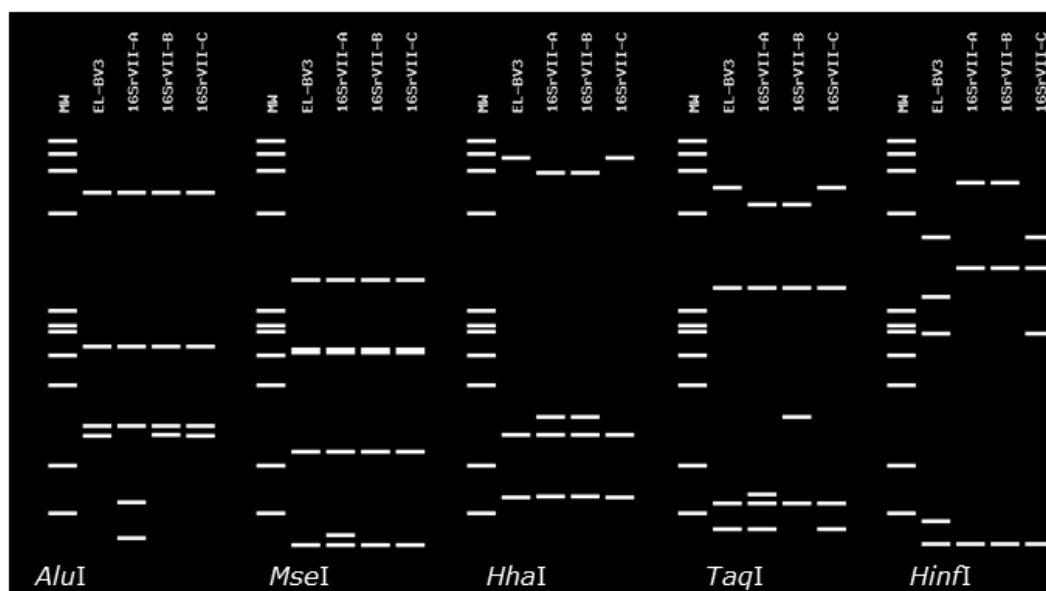


Figura 5.6: Patrones RFLP *in silico* generados a partir de la secuencia parcial del gen 16S (1.2kb, *primers* R16F2n/R16R2) del aislamiento EL-BV3 y fitoplasmas del grupo 16SrVII.16SrVII-A: fitoplasma AshY1 (AF092209), 16SrVII-B: fitoplasma ArtWBI (DQ989178) y 16SrVII-C: fitoplasma ArAWB (AY147038). MW: marcador de peso molecular:

3.3 Análisis filogenético

El alineamiento múltiple incluyó 92 secuencias (42 *Ca.* Phytoplasmas; 17 fitoplasmas del grupo 16SrXIII, 18 fitoplasmas del grupo 16SrIII, 10 fitoplasmas del grupo 16SrVII y los 10 aislamientos analizados) (ver tabla Anexa 2) y un total de 1255 sitios analizados, en cada secuencia. Se determinó mediante el uso del software jModelTest que el mejor modelo de sustitución posible (de un total de 56) es el GTR+I+G ($p\text{-inv}=0.2690$; $\text{gama shape}=0.4930$). En el árbol final obtenido (Figura 5.6) se observa una correspondencia con los resultados previos tanto de identidad nucleotídica como de análisis de patrones RFLP putativos.

Queda en evidencia la diversidad de fitoplasmas hallados puesto que desde el punto de vista de sus relaciones filogenéticas estos ocupan clados diversos dentro de los distintos subgrupos de fitoplasmas. Respecto a los aislamientos relacionados al grupo 16SrXIII, estos fueron agrupados dentro del mismo pero asociados de manera diferencial. Los aislamientos EL-Tc12, EL-Tc32 y EL-Tc40, fueron agrupados dentro de un mismo clado conjuntamente con fitoplasmas del subgrupo 16SrXIII-A (Figura 5.7). Estos resultados se condicen con lo hallado tanto en los valores de identidad nucleotídica como en los análisis de los patrones RFLP, para los aislamientos EL-Tc12 y EL-Tc32 (ambos del subgrupo 16SrXIII-A). A su vez, el aislamiento EL-Tc40, el cual había mostrado un valor de $F=0.95$ respecto del subgrupo 16SrXIII-A, fue también agrupado conjuntamente en este mismo clado. Lo que estaría indicando que dicho aislamiento podría ser considerado como parte del subgrupo 16SrXIII-A.

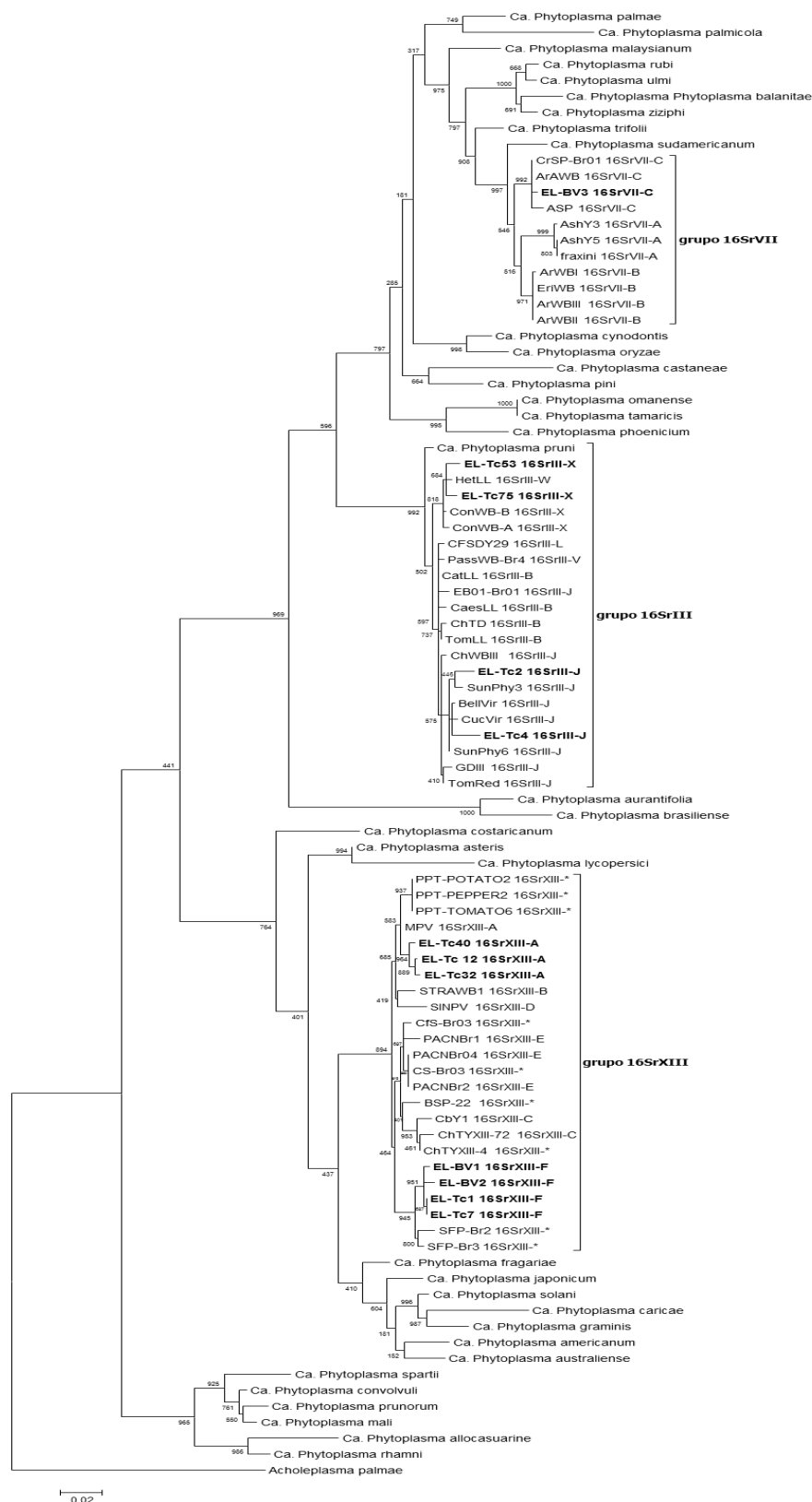


Figura 5.6: Árbol filogenético construido a partir de la secuencia parcial (1.2kb) del gen 16S rDNA mediante el método de Maximum-Likelihood. Se empleó la secuencia de los 35 “*Ca. Phytoplasma sp*” descritos hasta el momento, 17 fitoplasmas del grupo 16SrXIII, 18 de fitoplasmas del grupo 16SrIII, 10 del grupo 16SrVII y *Acholeplasma palmae* como extragrupo. Cada nodo presenta el valor de bootstrap (1000 réplicas). El número de acceso al GenBank de cada secuencia se describe en el Anexo (Tabla 2). En negrita las secuencias descritas en esta tesis.

Por su parte los aislamientos EL-Tc1, EL-Tc7, EL-BV1 y EL-BV2 fueron asociados conjuntamente con la secuencia de los fitoplasmas SFP-Br2/SFP-Br3, aunque formando un clado separado (Figura 5.7). Estos resultados indican que los aislamientos EL-Tc1, EL-Tc7, EL-BV1 y EL-BV2 así como también los aislamientos SFP-Br2/SFP-Br3, conforman un nuevo subgrupo (16SrXIII-F) sustentado no solo por la diferencia en los patrones RFLP, sino también por sus relaciones filogenéticas con el resto de los miembros del grupo 16SrXIII.

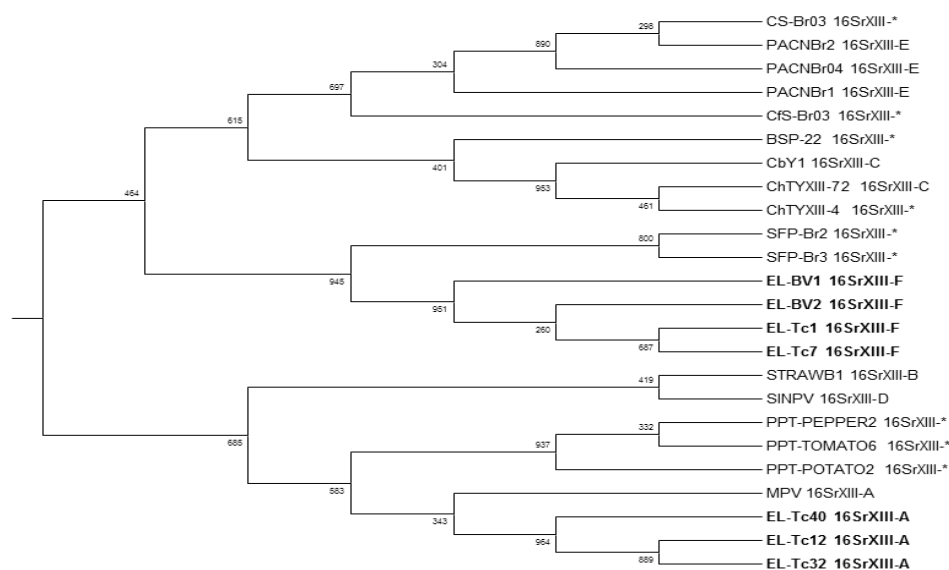


Figura 5.7: Detalle del árbol filogenético completo en donde se muestra con mayor detalle los agrupamientos generados en las secuencias de fitoplasmas asociados al grupo 16SrXIII. Las ramas con una resolución menor al 50% de bootstrap fueron colapsadas. En negrita las secuencias descritas en esta tesis.

Los aislamientos relacionados con fitoplasmas 16SrIII, fueron agrupados dentro del mismo clado (Figura 5.8). Por su parte, aislamientos EL-Tc2 y EL-Tc4 fueron vinculados más estrechamente con fitoplasmas del subgrupo 16SrIII-J. Para el caso del aislamiento EL-Tc4, esto resulta congruente con los resultados obtenidos a partir del análisis de los patrones RFLP, puesto que este último lo asigna como una variante del subgrupo 16SrIII-J. Por otro lado, el aislamiento EL-Tc2, el cual no pertenece al subgrupo 16SrIII-J por sus patrones RFLP ($F=0.95$), mostró una clara afiliación a los miembros de dicho subgrupo (Figura 5.8).

Por su parte, los aislamientos EL-Tc53 y EL-Tc75 se agruparon en un clado particular conjuntamente con los fitoplasmas ConWB-A, ConWB-B (ambos del subgrupo 16SrIII-X) y HetLL (subgrupo 16SrIII-W), aunque más cercanos a este último (Figura 5.8). Este resultado no coincide con el análisis de los patrones RFLP, ya que por esa técnica los aislamientos EL-Tc53 y EL-Tc75 mostrarían estar asociados al subgrupo 16SrIII-X.

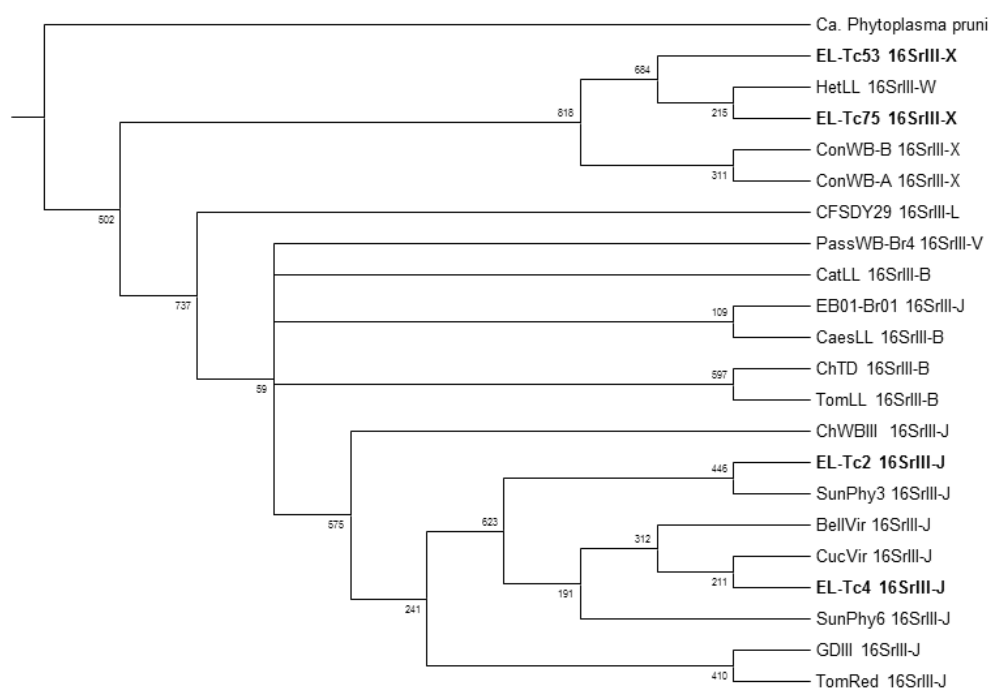


Figura 5.8: Detalle del árbol filogenético completo en donde se muestra con mayor detalle los agrupamientos generados en las secuencias de fitoplasmas asociados al grupo 16SrIII. Las ramas con una resolución menor al 50% de bootstrap fueron colapsadas. En negrita las secuencias descritas en esta tesis.

Por último, el aislamiento EL-BV3 se agrupó con los fitoplasmas del grupo 16SrVII. Dentro de este, formó un clado con los fitoplasmas ASP, ArAWB y CrSP, todos pertenecientes al subgrupo 16SrVII-C soportado por un valor de bootstrap de 992 (Figura 5.9). En este caso cada uno de los clados generados en el análisis filogenético permite diferenciar cada uno de los subgrupos dentro del grupo 16SrVII. Estos resultados se corresponden con los datos aportados por el análisis de la identidad nucleotídica y los análisis de RFLP *in silico*, en los que el aislamiento EL-BV3 se relacionaba más estrechamente con los miembros del subgrupo 16SrVII-C.

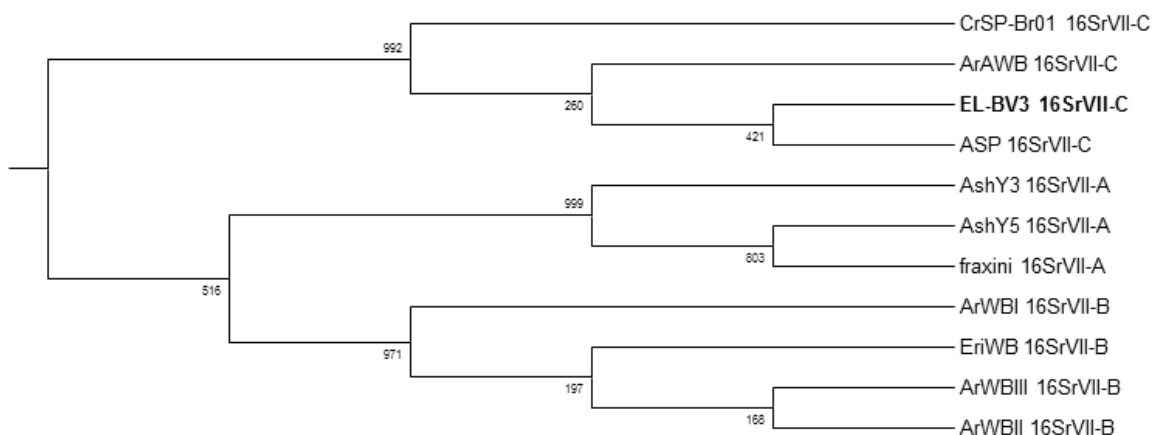


Figura 5.9: Detalle del árbol filogenético completo en donde se muestra con mayor detalle los agrupamientos generados en las secuencias de fitoplasmas asociados al grupo 16SrIII. Las ramas con una resolución menor al 50% de bootstrap fueron colapsadas. En negrita las secuencias descritas en esta tesis.

4. Discusión

En el presente capítulo se logró caracterizar molecularmente e inferir las relaciones filogenéticas de fitoplasmas asociados a la enfermedad de enrojecimiento letal de la frutilla en lotes productivos de localidades de Tucumán y Corrientes en Argentina. Dada la imposibilidad de cultivar fitoplasmas *in vitro*, el empleo de marcadores moleculares ha sido una de las herramientas más utilizadas para su estudio (Kirkpatrick y Smart, 1995). El gen de la subunidad ribosomal 16S rDNA sigue siendo el marcador más poderoso para la resolución taxonómica de los organismos procariotas y la filogenia derivada del análisis de dicho gen sigue constituyendo la columna vertebral de la sistemática en esta clase de organismos (Ludwig y Klenk, 2010). Basados en el análisis de los patrones RFLP del gen 16S rDNA generado a partir de 17 enzimas de restricción, Lee y col. (1998a) construyeron un sistema de clasificación general para fitoplasmas. Más de 30 grupos 16Sr basados sobre la base de los patrones RFLP reales o *in silico* (Zhao et al., 2009a) han sido descriptos. Basándonos en estos criterios, los fitoplasmas analizados en este capítulo han podido asociarse con 3 grupos 16Sr distintos: i) grupo 16SrXIII (aislamientos EL-Tc1, EL-7, EL-Tc12, EL-Tc32, EL-Tc40, EL-BV1 y EL-BV2); ii) grupo 16SrIII (aislamientos EL-Tc2, EL-Tc4, EL-Tc153 y EL-Tc75) y iii) grupo 16SrVII (aislamiento EL-BV3).

Si se tiene en cuenta el valor del coeficiente de similitud RFLP (F), el aislamiento EL-BV3 (Bella Vista, Corrientes) debiera ser considerado como un nuevo subgrupo dentro del grupo 16SrVII, puesto que difiere en el patrón de la enzima *HinfI* (F=0.95) respecto del patrón para el subgrupo 16SrVII-C. Sin embargo, tanto por similitud nucleotídica como por agrupamiento filogenético, este aislamiento debiera ser considerado dentro del subgrupo 16SrVII-C. En Argentina se ha reportado la presencia de dos fitoplasmas asociados a este subgrupo, el *Argentinian alfalfa aitches' broom* ArAWB (Conci et al., 2005) el cual ocasiona síntomas de escoba de bruja, proliferación de brotes, disminución del tamaño de hojas, clorosis, achaparramiento generalizado y aborto de flores en alfalfa y el fitoplasma *Argentinean Strawberry Phyllody* ASP (Fernández et al., 2013b) que ocasiona filodia en plantas de frutilla. En Brasil se ha confirmado también la presencia de un fitoplasma del subgrupo 16SrVII-C asociado al síntoma de proliferación de brotes en la especie *Crotalaria juncea* (Flores et al., 2013). El grupo 16SrVII (ash yellows) ha sido descrito solo en el continente americano y filogenéticamente está diferenciado en 3 clados que se corresponden con los subgrupos 16SrVII-A, VII-B y VII-C. El subgrupo VII-A se lo ha registrado siempre asociado con plantas leñosas tanto en América del norte (Griffiths et al., 1999) como en América del Sur (Filgueira et al., 2004; Fiore et al., 2007). Por su parte los subgrupos VII-B y VII-C solo han sido reportados afectando especies herbáceas y con un rango de distribución restringido al cono sur americano (Barros et al., 2002; Conci et al., 2005; Meneguzzi et al., 2008; Fernández et al., 2013b; Montano et al., 2011; Flores et al., 2013). Es por todo esto que consideramos que el aislamiento EL-BV3 debe ser considerado como una variable del subgrupo 16SrVII-C, ya que no solo fue estrechamente relacionado con dicho subgrupo, sino que además comparte un rango de distribución con el resto de fitoplasmas del mismo. La asignación de un fitoplasma a un subgrupo dado, aun con valores de F menores a 0.97 (por debajo de la línea de corte para subgrupo), ya ha sido reportada previamente por Galdeano y col. (2013). En dicho trabajo, se asignó al subgrupo 16SrIII-J al fitoplasma *Cucurbita virescence* (F=0.97 respecto a la cepa patrón del subgrupo 16SrIII-J) sustentado dicha asignación en las relaciones filogenéticas tanto del gen 16S como de los genes *rpLV-rpsC* (galdeano et al., 2013). Si bien la presencia de fitoplasmas del grupo 16SrVII-C ya han sido reportados en frutilla (Fernández et al., 2013b) la sintomatología descrita en cada caso no ha sido la misma, ya que para el

fitoplasma ASP el síntoma más característico fue la presencia de *filodia*, mientras que para el aislamiento caracterizado en el presente capítulo fue de *enrojecimiento letal*. El fitoplasma ASP solo fue registrado en el *cv.* Camino Real mientras que el aislamiento EL-BV3 fue registrado en *cv.* Camarosa. Estos resultados podrían sugerir una respuesta diferencial a la presencia de un mismo patógeno en función del genotipo que sirve de hospedante. Diferencias entre distintos cultivares de *Vitis vinífera* en términos de intensidad y frecuencia de síntomas, ha sido reportado cuando se han enfrentado estos a la infección por un mismo fitoplasma (Jaraush et al., 2013).

Los aislamientos EL-Tc2, EL-Tc4, EL-Tc53 y EL-Tc75, mostraron pertenecer al grupo 16SrIII (X-disease) ya sea por la identidad nucleotídica, los patrones RFLP y la filogenia. Los aislamientos EL-Tc2 y EL-Tc4 presentaron una relación más cercana a los fitoplasmas del subgrupo 16SrIII-J ($F=0.95$ para EL-Tc2, $F=0.98$ para EL-Tc4, respecto de la secuencia referencia) y el análisis filogenético agrupó a estos dos aislamientos, dentro del mismo clado, con fitoplasmas del subgrupo 16SrIII-J descritos para nuestra región. Por su parte por patrones de RFLP los aislamientos EL-Tc53 y EL-Tc75 presentaron una relación más estrecha con los fitoplasmas del subgrupo 16SrIII-X ($F=0.97$). Sin embargo según la filogenia estos aislamientos fueron más asociados al fitoplasma HetLL (subgrupo 16SrIII-W) que a los fitoplasmas ConWB-A/ConWB-B (subgrupo 16SrIII-X), aunque todos forman un clado particular separado del resto de los fitoplasmas del grupo X-disease. Se conoce que el grupo 16SrIII o X-disease es uno de los más numerosos no solo por la cantidad de aislamientos y subgrupos, sino por el amplio rango de hospedantes que presenta y la frecuencia de aparición. Hasta la fecha se han descrito 23 subgrupos dentro del grupo 16SrIII (Zhao et al., 2009a; Mello et al., 2011; Galdeano et al., 2013) dentro de los cuales los subgrupos III-B, III-J, III-X y III-W han sido registrados en el continente Sudamericano y los últimos tres de manera exclusiva en esta región. En Argentina se han descrito diversas especies de hospedantes vegetales para fitoplasmas del subgrupo 16SrIII-B, entre ellos paraíso (Galdeano et al., 2004), tomate, lagaña de perro *Caesalpinia gilliesii*, vinca (Galdeano et al., 2013) o duraznero (Fernández et al., 2013a), sin embargo ninguno de los aislamientos caracterizados en este capítulo pertenecen a este subgrupo. Por su parte, fitoplasmas del subgrupo 16SrIII-J han sido descritos afectando ajo (Galdeano et al., 2004), tomate,

coqueta (*Bellis perenis*), zapallito (Galdeano et al., 2013), remolacha azucarera y girasol (Guzman et al., 2014). Dos nuevos subgrupos, 16SrIII-X y 16SrIII-W, han sido reportados afectando *Conyza bonariensis* y *Heterothalamus alienus*, respectivamente (Galdeano et al., 2013). Los aislamientos descritos en esta tesis y asociados al grupo 16SrIII, están cercanamente relacionados con los subgrupos 16SrIII-J, 16SrIII-X y 16SrIII-W, lo que sugiere que la infección podría darse de manera local mediada por la acción de insectos vectores, con poca eficiencia juzgando el bajo porcentaje de plantas que aparecen infectadas con fitoplasmas de este grupo (para más detalle ver Capítulo II).

Estudios recientes han reportado la presencia de potenciales insectos vectores específicos del grupo 16SrIII en Brasil los cuales podrían estar involucrados en la transmisión del fitoplasma de dicho grupo al cultivo de brócoli (Eckstein et al., 2014). Por su parte en Argentina, se han identificado las especies de Cicadellidos *Agalliana ensigera* y *Paratanus exitiosus* como potenciales vectores del fitoplasma Garlic decline phytoplasma, perteneciente al subgrupo 16SrIII-J, agente causal de la enfermedad de “tristeza del ajo” (Catalano, 2011).

Por su parte EL-Tc1, EL-Tc7, EL-Tc12, EL-Tc32, EL-Tc40, EL-BV1 y EL-BV2, han sido incluidos como miembros del grupo 16SrXIII, pero en distintos subgrupos. Los aislamientos EL-Tc12, EL-Tc32 y EL-Tc40 presentaron valores de identidad en los patrones RFLP (F) de 1, 0.98 y 0.95 respectivamente, respecto a la secuencia del fitoplasma MPV (cepa patrón subgrupo 16SrXIII-A). Según estos valores los aislamientos EL-Tc12 y EL-Tc32 serían miembros del subgrupo 16SrXIII-A, mientras que el aislamiento EL-Tc40 podría pertenecer a un nuevo subgrupo aún no descrito, pero relacionado al subgrupo 16SrXIII-A. Sin embargo, el árbol filogenético incluyó las secuencias de estos aislamientos conjuntamente con la del fitoplasma MPV, y otros fitoplasmas relacionados a este último, por lo que sería conveniente analizar otras regiones genómicas para obtener una clasificación más certera del aislamiento EL-Tc40. Se ha reportado la utilización de marcadores genéticos adicionales tales como los genes de las proteínas ribosomales (rpLV-rpsC), el gen secY, gen tuf, gen groEL (Lee et al., 1994, 2004a,b, 2006b, 2010; Martini et al., 2002, 2007; Schneider et al., 1997; Mitrovic et al., 2011; Smart et al., 1996) y la región espaciadora 16S-23S para lograr

una diferenciación mas fina cuando el análisis particular del gen 16S no basta. El fitoplasma MPV (cepa referencia subgrupo 16SrXIII-A) fue citado por primera vez afectando plantas de vinca en México (Gundersen et al., 1994) y posteriormente afectando plantas de tomate en la península de baja California, México (Holguin-Peña et al., 2007). Si bien no existen publicaciones, en el banco de datos del NCBI se han depositado secuencias asociadas al fitoplasma *Mexican potato purple top* (16SrXIII-A) en tres hospedantes experimentales, tomate (*Solanum lycopersicum*) (JN087519), pimiento (*Capsicum annuum*) (JQ745314) y papa (*Solanum tuberosum*) (JN087521), los cuales han sido infectados empleando como vector al insecto *Bactericera cockerelli* (Sulc) (Hemiptera: Psyllidae). Estudios previos han demostrado que dicho insecto es vector del "*Candidatus Liberibacter psyllaourous*" (Hansen et al., 2008) y que posiblemente esté vinculado también con la transmisión de fitoplasmas en papa en la región Sureste de Estados Unidos y México (Muyanzena et al., 2007). Los tres aislamientos de fitoplasmas asociados al subgrupo 16SrXIII-A descritos en esta tesis se han registrado en el cv. *Camarosa*, el cual es importado como plantín desde la región de California (Estados Unidos) para luego ser multiplicado vegetativamente en viveros de Argentina. Dadas estas consideraciones, sumadas al hecho de que no existe registro de fitoplasmas del subgrupo 16SrXIII-A presentes ni en Argentina ni en Sudamérica, sería factible entonces especular que dichos fitoplasmas hayan sido importados en las plantas madre, las cuales luego de reproducirse agámicamente en viveros de nuestro país, son trasladadas a campo y allí se evidencia la presencia de los síntomas mencionados. Esta situación pone de manifiesto la necesidad de mejorar las medidas para la detección de esta clase de patógenos en plantas madres provenientes de viveros del exterior.

El análisis de los patrones RFLP, tanto *in silico* como en laboratorio, de los aislamientos EL-Tc1, EL-Tc7, EL-BV1 y EL-BV2 demostró que pertenecen al grupo 16SrXIII, pero formando un subgrupo particular. Los estudios llevados a cabo para inferir las relaciones filogenéticas respecto de otros fitoplasmas del mismo grupo, demostraron que ellos conforman un clado separado del resto, conjuntamente con la secuencia de dos aislamientos del fitoplasma *Strawberry Fruit Phyllody* (SFP) descrito en Brasil, en el mismo cultivo. El análisis de los patrones de RFLP *in silico* demostró la presencia de patrones diferenciales en 4 enzimas (*AluI*, *KpnI*, *HaeIII* y *RsaI*) que

claramente diferencian a estos aislamientos del resto de los subgrupos. Hasta la fecha se han descrito 5 subgrupos dentro del grupo 16SrXIII, 16SrXIII-A (Lee et al., 1998a, 2000); 16SrXIII-B (Jomantiene et al., 1998), 16SrXIII-C (Harrison et al., 2003), 16SrXIII-D (Santos-Cervantes et al., 2010) y 16SrXIII-E (Melo et al., 2013). Se propone, para el patógeno descrito en este trabajo, la designación de un nuevo subgrupo, 16SrXIII-F y asignarle el nombre de *Strawberry red leaf* (StrawRL), comprendido por los aislamientos StrawRL-Tc1 (KJ921641) (como cepa de referencia), StrawRL-Tc7 (KJ921642), StrawRL-BV1 (KJ921643) y StrawRL-BV2 (KJ921644) (Fernández et al., 2015).

En sudamerica, se descrito enfermedades asociadas a la presencia de múltiples fitoplasmas, entre las que se pueden mencionar el declinamiento-amarillamiento del paraíso (Harrison et al., 2003; Galdeano et al., 2004; Arneodo et al., 2004, 2007), el enanismo del brócoli (Eckstein et al., 2014), la proliferación de la santa rita (*Bougainvillea sp.*) (Silva et al., 2014), o la enfermedad del calix gigante en berenjena (Mello et al., 2011). La diversidad de fitoplasmas asociados a la enfermedad de enrojecimiento letal de la frutilla es, aunque en menor escala, un reflejo de la diversidad de fitoplasmas hallados en toda Sudamérica, aportando al concepto de que una ecología única y el aislamiento geográfico son las que han generado condiciones propicias para una divergencia evolutiva de los fitoplasmas presentes en esta región respecto de aquellos presentes en otras regiones (Montano et al., 2001, 2002), favorecida por el tipo de multiplicación agámica de esta especie y el movimiento continuo de material vegetal desde diferentes orígenes.

El estudio de la diversidad de fitoplasmas que afectan al cultivo de la frutilla en Argentina resulta de fundamental importancia ya que además de permitir completar el mapa de distribución y diversidad de estos patógenos en el cono sur americano, aporta información y datos que permitirán elaborar y generar herramientas para más y mejores estrategias de manejo de la enfermedad

Capítulo VI

Caracterización molecular de aislamientos del fitoplasma *China tree yellows* (16SrXIII-C) presentes en la Argentina

1. Introducción

El árbol de paraíso (*Melia azedarach*) es una especie que sirve de hospedante natural de distintas especies de fitoplasmas alrededor del mundo. Se ha registrado la presencia de fitoplasmas asociados al “*Ca. Phytoplasma asteris*” (16SrI-B) en China (Qui et al., 1998), Vietnam (Harrison et al., 2006) y Corea (Han et al., 2014). En Argentina el primer reporte de un organismo similar a fitoplasmas asociado a la enfermedad de *declinamiento del paraíso* fue realizado por Vázquez y col. (1983). Más adelante se confirmó la presencia de un fitoplasma mediante PCR y serología, relacionándolo con el grupo X-disease (Gomez et al., 1996). La primera caracterización molecular del fitoplasmas asociado al declinamiento del paraíso fue realizada por Galdeano y col. (2004), en la que basados en el perfil PCR-RFLP y la secuencia del gen 16Sr DNA, determinan que el fitoplasma asociado (China tree decline, ChTDIII) pertenece al grupo/subgrupo 16SrIII-B. Esta determinación posteriormente se confirma con la caracterización molecular de los genes rpLV-rpsC (Galdeano et al., 2013). Fitoplasmas del mismo subgrupo han sido registrados también afectando árboles de paraíso en Brasil (Duarte et al., 2009). Fitoplasmas del grupo 16SrXIII-C afectando el árbol de paraíso fueron por primera vez reportados en distintas localidades de Bolivia (Harrison et al., 2003) y posteriormente en Paraguay (Arneodo et al., 2005) y luego en Argentina (Arneodo et al., 2007). El fitoplasma descrito en Argentina, denominado *China tree yellows*, ha sido pobremente caracterizado desde el punto de vista molecular ya que los únicos datos con los que se cuenta corresponden al gen 16S rDNA. Para tener una visión más acabada es recomendable realizar estudios en otras regiones genómicas menos conservadas que sirvan de apoyo a la clasificación y filogenia generada a partir del operon rDNA. Los genes rpLv-rpsC (proteínas ribosomales) han sido empleados conjuntamente con el gen 16S rDNA en PCR-RFLP para complementar la clasificación basada en el perfil de restricción del gen 16S (Lee et al., 1998a). Los análisis filogenéticos llevados a cabo con los genes rpLV-rpsC han permitido elaborar árboles congruentes con los construidos a partir del gen 16S rDNA, incluso han permitido diferenciar más cantidad de subclados dentro de un mismo grupo que con el uso del gen 16S rDNA (Martini et al., 2007). Otro gen ampliamente utilizado es el que codifica la proteína secA, cuyas características se detallan en el Capítulo IV. Los análisis filogenéticos llevados a cabo con la secuencia parcial de dicho gen avalan los resultados

obtenidos con otros genes a la vez que han mejorado la resolución de grupos y subgrupos (Hodgetts et al., 2008). Contar con esta clase de información resulta de vital importancia, y más aun teniendo en cuenta que cada vez son más los trabajos que emplean otras secuencias además del gen 16S rDNA, para lograr una clasificación más acertada. A su vez, el empleo de otras secuencias además de la del gen 16S rDNA, es una herramienta cada vez más utilizada a la hora de describir nuevas especies de fitoplasmas o “*Candidatus* Phytoplasmas especies”, ya que define con mayor precisión las características de la nueva entidad. Teniendo en cuenta que el subgrupo 16SrXIII-C cumple “a priori” con las condiciones de ser considerada como una nueva especie (“*Candidatus* Phytoplasma sp”) de fitoplasma, el estudio de distintas regiones genómicas en distintos aislamientos del fitoplasma *China tree yellows* constituyen una oportunidad inmejorable para concretar una propuesta de una nueva especie.

Por otro lado, no se tiene información acerca de cuáles podrían ser los insectos vectores del fitoplasma ChTYXIII ni de las proteínas que a nivel molecular interaccionan con dichos insectos. Una aproximación al conocimiento de dichos mecanismos, es el estudio de regiones genómicas del patógeno que putativamente estarían involucradas en la interacción del fitoplasma con el vector. Al igual que otros *Mollicutes* como los mycoplasmas, los fitoplasmas carecen de pared celular, razón por la cual sus proteínas de membrana están en contacto directo con el citoplasma de las células hospedantes y es por ello que podrían tener un rol importante en la interacción entre la bacteria y el hospedante (Kakizawa et al., 2006 a, b). Del total de las proteínas de membrana de fitoplasmas, las proteínas inmunodominantes de membrana (immunodominant membrane proteins; IDP's), constituyen la porción más importante del total de proteínas de membrana en la mayoría de los fitoplasmas (Shen y Lin, 1993). Estas IDPs han sido clasificadas en tres grupos: i) immunodominant membrane protein (Imp), ii) immunodominant membrane protein A (IdpA) y iii) antigenic membrane protein (Amp), siendo estas no ortólogas entre sí (Barbara et al., 2002, Kakizawa et al., 2006a, b). Estudios previos han demostrado que las IDPs son altamente variables dentro de un mismo tipo, sugiriendo que estas proteínas están sometidas a una alta presión de selección (Barbara et al., 2002; Kakizawa et al., 2004; Morton et al., 2003). Los trabajos de Kakizawa y col (2006b) sugieren que la presión de selección fue más

fuerte sobre los genes amp que sobre los imp en el grupo de los AY al menos. Ello condice con el hecho de que los genes amp son notablemente más variables (Kakizawa et al., 2009). La acumulación de proteína Amp en los tejidos infectados es muy superior a Imp, lo que apoya su rol como proteína inmunodominante, sin embargo, el hecho de que la proteína Imp haya sido detectada en numerosos grupos de fitoplasmas sostiene la idea de que esta podría ser la proteína ancestral y luego las demas (Amp e IdpA) fueron incrementándose en los diferentes grupos (Kakizawa et al 2009). En contraste, la proteína IdpA (IDP del fitoplasmas Western X), no ha sido registrada en el genoma de otros fitoplasmas (Oshima et al., 2004; Bai et al., 2006; Kuber et al., 2008; Tran-Nguyen et al., 2008; Mitrovic et al., 2014; Kakizawa et al., 2014; Chen et al., 2014). Tampoco ha podido ser registrada la presencia de la proteína amp en el genoma secuenciado del fitoplasma “*Ca. Phytoplasma mali*” (Kube et al., 2008). Estas observaciones implicarían que un fitoplasma antecesor posiblemente haya tenido la proteína imp, y subsecuentemente los fitoplasmas que evolucionaron a partir de este en los distintos grupos 16Sr hayan aumentado la expresión de las IDPs amp o IdpA dependiendo del caso (Kakizawa et al., 2009). Los genes ortólogos son aquellos que han surgido como producto de la especiación, y que como consecuencia pueden encontrarse en diferentes especies, muy similares y generalmente cumplen la misma función, debido a que se han originado en un ancestro común (Fitch, 1970). Los tres tipos de IDP en fitoplasmas no son ortólogas, puesto que tienen una baja identidad, están ubicadas en diferentes regiones del genoma y cumplen funciones distintas.

La proteína Amp es sometida a una presión de selección positiva, es decir que los cambios a las que se ve sujeta representan una ventaja sobre la aptitud biológica del organismo. La mayoría de las sustituciones en la proteína Amp se registraron en la región central hidrofílica, sugiriendo que las sustituciones en esa porción de dicha proteína le ofrece al fitoplasma una ventaja jugando un rol importante en la interacción con su hospedante (Kakizawa et al., 2006a, b).

Otros estudios han demostrado que la proteína Amp del fitoplasma OY-M, forma un complejo con la red de microfilamentos del tracto intestinal en insectos vectores de dicho fitoplasma. Esta formación del complejo se da exclusivamente entre el fitoplasma

OY-M y los insectos que son vectores de este patógeno, de modo que es determinante en la transmisibilidad del patógeno, es decir que la interacción Amp-microfilamentos se da de manera específica con las proteínas de los insectos vectores (Susuki et al., 2006). También se ha demostrado que la proteína Amp interacciona con las subunidades α y β de la ATP sintetasa, y que esta interacción también se correlaciona con la transmisibilidad del fitoplasma (Galletto et al., 2011).

Por su parte, se ha demostrado que la proteína imp del fitoplasma “*Ca. Phytoplasma mali*” interacciona físicamente con las actinas de plantas tanto *in vivo* como *in vitro*, y se hipotetiza con que esta unión estaría relacionada con mecanismos de movilidad dentro de la célula por parte del fitoplasma (Boonrod et al., 2012). Se ha demostrado, aunque de manera preliminar, una interacción *in vitro* entre el dominio extracelular de la imp del fitoplasma Lime witches’ broom y la proteína ATP sintetasa de algunos de sus insectos vectores (Siampour et al., 2011).

Queda entonces en evidencia la importancia que tienen las proteínas IDPs en lo que a interacción fitoplasma-hospedante se refiere y fue por ello que se consideró relevante la caracterización de genes involucrados en los mecanismos de interacción del fitoplasma ChTYXIII, para dar inicio a estudios que apunten a la identificación precisa de insectos vectores y el conocimiento de los mecanismos mediante los cuales interactúan con estos últimos. A su vez el estudio de regiones genómicas conservadas, permitirán evaluar de manera más precisa la clasificación de dicho patógeno y de qué manera se relaciona desde el punto de vista filogenético con fitoplasmas de la región.

En función a lo anteriormente expuesto se proponen los siguientes objetivos específicos:

Objetivo específico 4: Determinar la variabilidad intra e interespecífica en regiones genómicas conservadas de distintos aislamientos geográficos de los fitoplasmas *Strawberry Red Leaf* y *China tree yellows*, y realizar estudios filogenéticos utilizando las mismas.

Objetivo específico 5: Determinar el tipo, secuencia y estructura de la/las proteínas inmunodominantes de membrana presentes en el fitoplasma *China tree yellows*, establecer estudios comparativos con las de otros fitoplasmas, y determinar la

variabilidad existente tanto en los dominios transmembrana como en los dominios extracelulares de las mismas.

2. Materiales y métodos

A diferencia de la caracterización molecular llevada a cabo en fitoplasmas asociados al *enrojecimiento letal* en frutilla, para el fitoplasma *China tree yellows* (ChTYXIII, 16SrXIII-C), asociado al *declinamiento* en paraíso, se analizaron 3 regiones genómicas conservadas, a saber: i) segmento parcial del gen 16Sr DNA (1.2kb) ii) genes rpLV-rpsC(1.3kb) y iii) región parcial del gen secA (0.6kb), las cuales serán empleadas para su clasificación y evaluación de relaciones filogenéticas. Por otra parte se caracterizó el gen *amp*, de naturaleza poco conservada, cuya proteína se ha relacionado con mecanismos de interacción patógeno-vector.

2.1 Obtención de aislamientos

Tal como fuera descrito en el Capítulo II, se realizaron muestreos para la recolección de material de paraíso con sintomatología de declinamiento, en diferentes regiones de Argentina donde el paraíso este presente como ornamental, forestal o como especie endémica. Tanto la detección por PCR, como la identificación mediante PCR-RFLP, de aislamientos del fitoplasma ChTYXIII se describen en Capítulo II. Para la caracterización molecular fueron seleccionados 5 aislamientos del fitoplasma ChTYXIII recolectados en distintas regiones geográficas: aislamiento ChTYXIII-Mo3 (Montecarlo, Misiones), ChTYXIII-Ce3 (Cerro Azul, Misiones), ChTYXIII-RS3 (Presidencia Roque Sáenz Peña, Chaco), ChTYXIII-It27 (Itatí, Corrientes) y ChTYXIII-Ya4 (Yapeyú, Corrientes). Porciones de peciolo y hojas sintomáticas de cada uno de los aislamientos, así como el ADN total extraído mediante el método de CTAB (Doyle y Doyle, 1990), se mantuvieron en freezer a -80°C como material de reserva o hasta su uso.

2.2 Clonado y secuenciación de los genes 16Sr DNA, genes rpLV-rpsC y secA

2.2.1 Amplificación mediante PCR

Para las reacciones de PCR se empleó como ADN molde el ADN total extraído de los 5 aislamientos del fitoplasma ChTYXIII, y ADN total de paraíso sano como control negativo. Para los distintos genes se emplearon las siguientes condiciones:

Gen 16Sr DNA: Para la amplificación del segmento parcial del gen16S rDNA (1.2kb) se empleó el juego de *primers* R16F2/R16R2 (Lee et al., 1993) siguiendo las condiciones propuestas en el Capítulo III.

Genes rpLV-rpsC: Para la amplificación de los genes rpLV-rpsC (1.3kb) se empleó el juego de *primers* rpF1/rpR1 (Lim y Sears, 1992) siguiendo las condiciones propuestas por los autores (ver Anexo, condiciones de PCR).

Gen secA: Para el gen *secA*, se tomó como referencia la secuencia parcial de 840pb del gen *secA* del fitoplasma ChTYXIII (aislamiento Montecarlo) (Capítulo IV) y se diseñó un juego de *primers* específico *secA*-ChTYFw1 (5'-GCTTTAAGCGGAAATCCCGTCCAT-3') *secA*-ChTYRv1 (5'-AACCCCTTCCTTAGCTTCTAAGGC-3') empleando el software Amplifix v 1.7.0 (<http://crn2m.univ-mrs.fr/pub/amplifx-dist>) (ver Anexo, condiciones de PCR).

Por otro lado, para comprobar la especificidad del juego de *primers* *secA*-ChTYFw1/*secA*-ChTYRv1 se realizaron PCR con las condiciones descritas anteriormente usando como molde ADN total de 103 muestras de fitoplasmas de distintos grupos/subgrupos 16Sr (16SrXIII-C, 16SrXIII-F, 16SrIII-B, 16SrIII-J, 16SrVII-C, 16SrI-B).

2.2.2 Ligación y transformación

El producto amplificado de cada uno de los tres genes para los 5 aislamientos analizados fue purificado mediante columnas S-400 HR (GE, UK) de acuerdo a las condiciones sugeridas por la empresa. Los productos purificados se ligaron al vector pGEM T-Easy system (Promega, USA) tal como se describe en el Capítulo V. Para la transformación se emplearon 50µl de células competentes de *E. coli* DH5α y 5-7µl del producto de ligación. La transformación se llevó a cabo mediante shock térmico a 42°C siguiendo protocolos previamente establecidos (Sambrook et al., 1989). La recuperación de las bacterias se realizó en media LB líquido (500µl) durante 45 minutos a 37°C y agitación continua (150rpm).

2.2.3 Selección de clones transformantes

La selección de clones transformantes se llevó a cabo mediante PCR de colonia empleando *primers* universales que hibridan por fuera del sitio de clonado en el vector T7-SP6 y por liberación del inserto mediante restricción según lo descrito en el punto 2.3.2 del Capítulo V. Se purificó el ADN plasmídico de 3 clones positivos para los 5 aislamientos en los genes 16S rDNA, rpLV-rpsC y secA, y de 1 clon para las proteínas inmunodominantes de membrana.

2.2.4 Ensamblaje de las secuencias

Las secuenciaciones se realizaron en la Unidad de Genómica dependiente del Instituto de Biotecnología (CICVyA-INTA, Argentina) y en Macrogen (Corea). El ensamblaje de las secuencias se realizó empleando el software SeqMan (DNASTAR vers. 8, Lasergene software) y se realizaron ajustes manuales cuando fue necesario.

2.3 Análisis de las secuencias

2.3.1 Cálculo de la similitud nucleotídica

Para el caso de la secuencia del gen 16S rDNA, se empleó el software CLUSTALW2 (<http://www.ebi.ac.uk/support/support/ClustalW2>) para obtener los valores de similitud nucleotídica. En este, la secuencia de los 5 aislamientos fue comparada con la secuencia de todos los “*Candidatus Phytoplasma sp*” descritos hasta la fecha, y las secuencias de fitoplasmas del grupo 16SrXIII disponibles en el banco de genes (NCBI).

Para el caso de las secuencias de los genes rpLV-rpsC y secA, en primer lugar se procedió a identificar el marco abierto de lectura para cada uno de los genes mediante el software ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>). Una vez determinado el mismo se calcularon los índices de similitud tanto nucleotídica como aminoacídica. La cantidad de secuencias disponibles de los genes rpLV-rpsC y secA para fitoplasmas es menor a la del gen 16S rDNA, de modo que solo se trabajó con las secuencias más relacionadas al grupo 16SrXIII que estuvieran disponibles en el banco de genes, con la finalidad de determinar cuán diferente es el fitoplasma *China tree yellows* respecto de los “*Ca. Phytoplasma especies*” más cercanos y de ese modo determinar si cumple con las características para ser descrito como una nueva especie.

El cálculo de los valores de similitud se realizó de la misma manera que para el gen 16S rDNA.

2.3.2 Patrones RFLP *in silico*

Para la secuencia del gen 16S rDNA (1.2kb), se obtuvieron los patrones de restricción con las 17 enzimas propuestas en los sistemas de clasificación de fitoplasmas (Lee et al., 1998) empleando la herramienta *online* *iPhyClassifier* (<http://plantpathology.ba.ars.usda.gov/cgi-bin/resource/iphyclassifier.cgi>) (Zhao et al., 2009). Los patrones obtenidos se compararon con aquellas secuencias patrón de los subgrupos 16SrXIII-A, -B, -C, -D, -E y -F y se calcularon los coeficientes de similitud (F) de acuerdo con lo propuesto por Nei y Li (1983).

Para el análisis de los patrones RFLP putativos de la secuencia de los genes *rpLV-rpsC* (1.3kb) se utilizó el software *pDRAW32* versión 1.1.121 (www.aacalone.com). Se generaron los perfiles de restricción con las 17 enzimas empleadas para el gen 16S rDNA, y se compararon los patrones con los de las secuencias de los fitoplasmas MPV (16SrXIII-A) y STRAWB1 (16SrXIII-B), que son los únicos disponibles en banco de datos. En este caso no fue requerido el cálculo de un coeficiente de similitud de los patrones RFLP, pero si se analizó la presencia de enzimas que generen patrones diferenciales y que con ello permitan la distinción entre los distintos subgrupos.

En el caso del gen *secA* dado que el fragmento amplificado es menor al que se emplea en el análisis de los patrones RFLP (Hodgetts et al. 2008), los patrones generados no podrían compararse con lo de las secuencias patrón y por consiguiente no es posible llevar a cabo este análisis.

2.3.3 Análisis filogenético

El análisis filogenético se condujo de manera independiente para cada uno de los genes analizados, es por ello que la cantidad de secuencias empleadas en cada caso dependió de la disponibilidad de los mismos en los bancos de datos. Para cada gen, los alineamientos múltiples se generaron empleando *CLUSTALW* implementado en el software *MEGA* versión 6 (Tamura et al., 2013). Se tuvo en cuenta la porción de secuencia en la que estuvieran representados todos los aislamientos y de ese modo

garantizar una total cobertura a lo largo del todo el alineamiento en cada una de las secuencias. Una vez alineadas las secuencias, se determinó el mejor modelo de sustitución nucleotídica, mediante el software jModelTest 2.1.6 (Darriba et al., 2011). Una vez calculado este y sus respectivos parámetros, se construyeron los árboles filogenéticos empleando el método de Maximum-Likelihood con el software disponible online PhyML 3.0 (<http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/>) (Guidon et al., 2010). Para otorgarle soporte estadístico a los clados generados se realizó un remuestreo mediante un bootstrap no paramétrico con 1000 réplicas. Los árboles resultantes fueron editados con el programa MEGA versión 6.

2.4 Caracterización molecular de regiones genómicas relacionadas con mecanismos de interacción: proteínas inmunodominantes de membrana (IDPs)

De los tres tipos de IDPs caracterizadas en fitoplasmas, en este capítulo se trabajó con las proteínas *imp* y *amp*. Dado que la proteína IdpA solo ha sido detectada en fitoplasmas del grupo 16SrIII no será tenida en cuenta en este análisis.

2.4.1 Amplificación de un fragmento genómico que contiene el gen que codifica la proteína *imp*, mediante PCR

En las reacciones de PCR se emplearon por un lado el juego de cebadores Rnc-1 y PssA-1 los cuales amplifican un fragmento de 5kb que contiene los genes *rnc-dnaD-imp-pyrG-PssA* (Kakizawa et al., 2009); y por otro lado se diseñaron cebadores degenerados en base a las secuencias disponibles en banco de datos de los genes *dnaD* (cebador Forward) y *pyrG* (cebador Reverse) de los fitoplasmas “*Ca. Phytoplasma asteris*” OY-M (16SrI-B), “*Ca. Phytoplasma australiense*” (16SrXII-B) y Strawberry lethal yellows (16SrXII-B). Se alinearon las secuencias completas conteniendo los genes *dnaD-imp-pyrG* mediante CLUSTALW en el software MEGA6 y se identificaron zonas conservadas propicias para la generación de *primers*, que hibriden por fuera de la secuencia del gen *imp*. Los *primers* degenerados fueron diseñados manualmente y luego su calidad fue controlada mediante la herramienta *online* Oligo Analyzer 3.1 (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>).

Para la puesta a punto del PCR se empleó como molde ADN total de vinca infectada con el fitoplasma ACLL (16SrI-S) mantenido en invernadero (como control positivo de la existencia del gen), ADN total de paraíso infectado con el fitoplasma ChTYXIII (aislamiento Montecarlo) y sus respectivos controles sanos.

Las distintas variables ensayadas en todas las opciones combinatorias fueron:

1. Concentración de ADN molde: se probaron distintas concentraciones de ADN molde 25, 50, 75 y 100ng/reacción.

2. Enzima polimerasa: Se probaron distintas enzimas polimerasas con distintos grados de procesividad: Dream® Taq polymerase (Fermentas), Hi-Fi polimerase (Kapa Biosystems) y Kapa3G (Kapa Biosystems) (altamente procesivas) y GoTaq® (Promega) y Taq DNA polymerase (Invitrogen) (procesividad normal) en concentraciones de 1U, 1.5U y 2U por reacción.

3. Concentración de MgCl₂: estándares para cada enzima según especificaciones del fabricante y 25% aumentada. Se probó aumentando la concentración de MgCl₂ para disminuir la especificidad de las polimerasas y aumentar las chances de amplificación de los fragmentos deseados.

4. T° annealing: Para determinar la T° optima de annealing se realizaron PCR en gradientes en los que se probaron 6°C por encima y por debajo de la T° de annealing putativa.

2.4.2 Amplificación de un fragmento genómico que contiene la proteína *amp*, mediante la técnica de PCR

Para amplificar el gen que codifica la proteína *amp*, en los 5 aislamientos del fitoplasmas ChTYXIII, se procedió de manera similar que para el gen *imp*, probándose *primers* previamente citados, y *primers* diseñados en base a las secuencias de bancos de datos. De los citados por la bibliografía se probaron dos juegos de *primers*, el juego ES-1/nad-2 (Kakizawa et al., 2006b) y el juego Stgro-F1/PAUnadR1 (Fabre et al., 2011), los cuales amplifican fragmentos de 3.6kb y 2.2kb, respectivamente, conteniendo los

genes *groEL-amp-nadE*. El diseño de *primers* degenerados se llevó a cabo en base a la secuencia de genes flanqueantes *groEL* (cebador forward) y *nadE* (primer reverse) de los fitoplasmas “*Ca. Phytoplasma asteris*” OY-M (16SrI-B), “*Ca. Phytoplasma australiense*” (16SrXII-B), Strawberry lethal yellows (16SrXII-B). Para la puesta a punto de las reacciones de PCR se procedió utilizando diferentes opciones combinadas de la misma manera que se describe en 2.4.1.

2.4.3 Clonado y secuenciación de los fragmentos amplificados

Los productos amplificados fueron clonados en el vector pGEM T-Easy system (Promega, USA) tal cual fuera descrito con anterioridad. Cuando los fragmentos clonados, debido a su longitud, no pudieron ser secuenciados en una sola reacción se empleó la estrategia de *primer walking* para completar la secuencia. Los fragmentos clonados de hasta 1.5kb fueron secuenciados en la Unidad Genómica-Instituto de Biotecnología (C.I.C.V.y A., INTA), mientras que los fragmentos mayores a 1.5kb fueron secuenciados en Macrogen (Corea). El ensamblaje de las secuencias se realizó empleando el software SeqMan (DNASTAR vers. 8, Lasergene software), cuando fue necesario las secuencias se editaron de manera manual.

2.4.4 Análisis de las secuencias

Una vez obtenida la secuencia consenso se procedió a la determinación de los marcos abiertos de lectura (ORF) y así la secuencia de residuos correspondientes a las proteínas *imp* y *amp*. Para esto se empleó la herramienta *online* AMIGene (Annotation of Microbial Genes), la cual es una aplicación que permite la identificación de secuencias codificantes (CDSs) en los que emplea modelos de Markov ajustados a los datos de entrada (es decir, el gen modelo) seguido por la búsqueda de genes conocidos y un enfoque heurístico para la búsqueda de las CDSs más probables. Una vez determinadas las CDSs para las proteínas en estudio, su secuencia aminoacídica fue analizada mediante BLASTp (database: nr/Algorithm: protein-protein BLAST parámetros por default) con el fin de identificar secuencias homólogas en el banco de datos. Se analizó la presencia de dominios conservados mediante la herramienta Conserve Domain Database del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>). Se predijo la secuencia del péptido señal y el sitio de escisión del mismo con el programa SignalIP

v4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), así como también la presencia de los dominios transmembrana con el programa TMHMM v2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>). Los parámetros físico-químicos de las proteínas putativas se analizaron con el programa ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>), y su posible ubicación subcelular con el programa PSORTb v3.0.2 (<http://www.psort.org/psortb/index.html>).

Una vez identificadas las distintas regiones de las IDPs secuenciadas (péptido señal regiones transmembrana entre otras), se calcularon los valores de identidad nucleotídica y aminoacídica respecto de las secuencias en otras especies emparentadas.

Por ultimo se realizo un análisis de la presión de selección en las proteínas IDPs secuenciadas. Para ello, en cada codón se estimo el número de sustituciones sinónimas (s) y no sinónimas (ns). Las estimaciones se llevaron a cabo mediante la reconstrucción del estado ancestral que tiene en cuenta el criterio de máxima verosimilitud, bajo los modelos Muse-Gaunt (Muse y Gaunt, 1994) y Felsenstein (Felsenstein, 1981) para las sustituciones aminoacídicas y nucleotídicas respectivamente. El test estadístico dN-dS (dN=número de sustituciones no sinónimas por sitio, dS= número de sustituciones sinónimas por sitio), fue empleando para la detección de codones sometidos a presión de selección positiva, con sus respectivos p-values. En caso de valores positivos para el estadístico dN-dS, indican una abundancia de sustituciones no sinónimas. El valor normalizado dN-dS fue utilizado para comparar los sets de datos de la presenter tesis respecto de otros set de datos para IDPS. Los valores de dS y dN fueron calculados bajo el criterio de máxima verosimilitud empleando el paquete HyPhy implementado en el software MEGA 6 (Tamura et al., 2013).

3. Resultados

Genes 16Sr DNA, rpLV-rpsC y secA

3.1 Amplificación mediante PCR

A partir del ADN extraído de los 5 aislamientos del ChTY 16SrXIII-C se logró amplificar bandas del tamaño esperado para los genes 16S rDNA y rpLV-prsC (1.2kb y 1.3kb, respectivamente) (Figura 6.1) y para el gen secA (0.65kb) (Figura 6.2). No se observó la presencia de bandas espúrias, ni amplificación en ninguno de los controles negativos empleados (ADN de planta sana, mezcla de reacción).

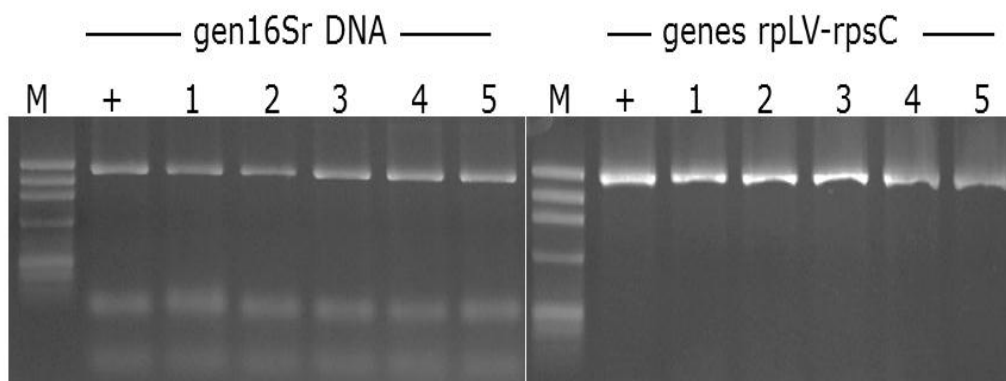


Figura 6.1: Producto de amplificación de PCR para los genes 16Sr DNA (1.2kb) y rpLV-prsC (1.3kb). 1-5: aislamientos del fitoplasma ChTYXIII (1: ChTYXIII-It27, 2: ChTYXIII-Ya4, 3: ChTYXIII-RS3, 4: ChTYXIII-Mo3 y 5: ChTYXIII-Ce3). +: Control positivo y M: marcador peso molecular Φ 174-HaeIII 72, 118, 194, 234, 271, 281, 310, 603, 872, 1078 y 1353pb (NEB).

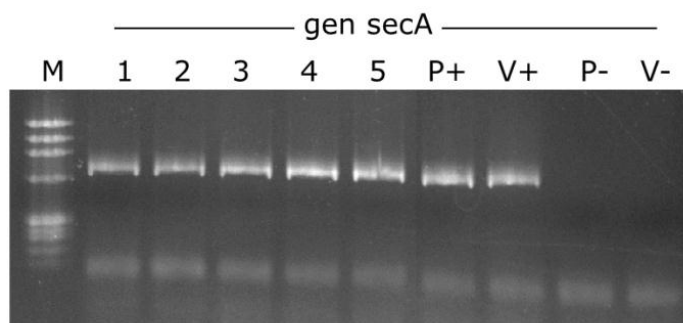


Figura 6.2: Productos de PCR amplificados mediante los *primers* específicos secA-ChTYFw1/secA-ChTYRv1. M1-5: aislamientos del fitoplasma ChTYXIII (1: ChTYXIII-It27, 2: ChTYXIII-Ya4, 3: ChTYXIII-RS3, 4: ChTYXIII-Mo3 y 5: ChTYXIII-Ce3), P(+): paraíso infectado con el fitoplasma ChTYXIII (invernadero), V(+): vinca infectada con el fitoplasma ChTYXIII, P(-) y V(-): paraíso y vinca sanos. M: marcador peso molecular Φ 174-HaeIII 72, 118, 194, 234, 271, 281, 310, 603, 872, 1078 y 1353pb (NEB).

3.2 Prueba de especificidad del juego de *primers* secA-ChTYFw1/secA-ChTYRv1

El análisis llevado a cabo con los *primers* P1/P7 demostró la presencia de fitoplasma en todas las muestras analizadas (103/103), pero cuando se empleó el juego de *primers* secA-ChTYFw1/secA-ChTYRv1 solo se observaron amplificaciones del tamaño deseado en los aislamientos del grupo/subgrupo 16SrXIII-C (Tabla 6.1).

Tabla 6.1: Especificidad del juego de *primers* secA-ChTYFw1/secA-ChTYRv1 frente a aislamientos de fitoplasmas de grupos 16Sr. N°: número de muestras analizadas, P1/P7(+): número de muestras PCR positivas con los *primers* universales para la detección de fitoplasmas; secA (+): número de muestras PCR positivas con los *primers* específicos de la proteína secA.

| Fitoplasma | Grupo 16Sr | Hospedante | N° | P1/P7 (+) | secA(+) |
|----------------------------------|------------|---|------------|------------|-----------|
| <i>China tree yellows</i> | 16SrXIII-C | Paraíso (<i>Melia azedarach</i>) | 49 | 49 | 49 |
| <i>China tree decline</i> | 16SrIII-B | Paraíso (<i>Melia azedarach</i>) | 26 | 26 | 0 |
| <i>Garlic decline</i> | 16SrIII-J | Ajo (<i>Allium sativum</i>) | 5 | 5 | 0 |
| <i>ACLL</i> | 16SrI-B | Vinca (<i>Catharanthus roseus</i>) | 5 | 5 | 0 |
| <i>ArAWB</i> | 16SrVII-C | Alfalfa (<i>Medicago sativa</i>) | 3 | 3 | 0 |
| <i>Strawberry phyllody</i> | 16SrVII-C | Frutilla (<i>Fragaria x ananassa</i>) | 2 | 2 | 0 |
| <i>Strawberry red leaf</i> | 16SrXIII-F | Frutilla (<i>Fragaria x ananassa</i>) | 3 | 3 | 0 |
| <i>Argentinean peach yellows</i> | 16SrIII-B | Duraznero (<i>Prunus pérsica</i>) | 10 | 10 | 0 |
| | | Total | 103 | 103 | 49 |

3.3 Ligación, transformación y selección de clones transformantes

Se logró clonar los fragmentos amplificados de los genes 16Sr DNA, rplv-rpsC y secA de los 5 aislamientos del fitoplasma ChTYXIII. Por cada aislamiento y gen se probaron 10 colonias blancas mediante PCR colonia, de las cuales 3 fueron seleccionadas para cada aislamiento y cada gen, el ADN plasmídico purificado y enviado a secuenciar.

3.4 Ensamblaje de las secuencias

Se obtuvieron secuencias consensos en cada aislamiento/gen con una cobertura promedio de 3X por cada nucleotido. En cada una de estas secuencias se eliminaron los fragmentos correspondientes al plásmido y se verificó la presencia de la secuencia correspondiente a los *primers*.

3.5 Análisis de las secuencias de los genes 16S rDNA, rpLV-prsC y secA

3.5.1 Análisis de similitud

Gen 16Sr DNA

El análisis de la similitud de las secuencias del gen 16S rDNA reveló que entre los 5 aislamientos del fitoplasma ChTYXIII los valores de identidad varían entre 99.68% y 99.92%. Respecto a la secuencia de fitoplasmas del grupo 16SrXIII, se encontró que los mayores valores de similitud se dieron con los fitoplasmas (Bolivia) miembros del subgrupo 16SrXIII-C. Con el fitoplasma *Chinaberry yellows* (CbY1) (cepa de referencia del subgrupo 16SrXIII-C) (Harrison et al. 2003) se registraron valores entre 99.27% y 99.51% y entre 99.51% y 100%, respecto de la secuencia de los aislamientos del fitoplasma *China tree yellows* (ChTYXIII) ChTYXIII-4 y ChTYXIII-72, ambos previamente descritos en Argentina (Arneodo et al., 2007).

Para la definición de un nuevo “*Ca. Phytoplasma especie*” es condición necesaria que el valor de similitud nucleotídica no supere el 97,5% respecto de la secuencia descrita de todos los “*Ca. Phytoplasma sp.*” que se hayan descrito hasta la fecha. Se calcularon los valores de identidad nucleotídica respecto de la secuencia del gen 16SrDNA de todos los “*Ca. Phytoplasma sp.*” descritos hasta el momento y en ningún caso los valores de similitud hallados superaron el 97.5% (Anexo Tabla 7). Siguiendo el criterio para el establecimiento de un nuevo ‘*Ca. Phytoplasma*’

Genes rpLV-rpsC

Se logró secuenciar un fragmento de 1259pb en todos los aislamientos del fitoplasma ChTYXIII. Los porcentajes de similitud nucleotídica entre los distintos aislamientos del fitoplasma ChTYXIII fue del 100%. Respecto de otros fitoplasmas del grupo 16SrXIII,

los valores de identidad fue de 95.14% con el fitoplasma MPV (16SrXIII-A, EF193365) y de 94.5-93.99% con el fitoplasma STRAWB1 (16SrXIII-B, U96615). Es importante mencionar que estas dos secuencias son las únicas del grupo 16SrXIII disponibles en banco de datos.

Dado que estos genes se traducen en proteínas, a diferencia del gen 16SrDNA, se obtuvieron los marcos abiertos de lectura para ambos en cada una de las secuencias (Tabla 6.2), siendo estas exactamente iguales en los 5 aislamientos del fitoplasma ChTYXIII. Para el gen *rpLV*, el ORF putativo está comprendido entre los nucleótidos 134-529 (131aa), el cual codifica a una proteína con un peso molecular estimado de 14,53 kDa. Comparado con el mismo ORF de los fitoplasmas MPV y STRAWB1, presentan la misma longitud y pesos moleculares similares (Tabla 6.2). El valor de identidad aminoacídica para el gen *rpLV* respecto del fitoplasma MPV fue de 93.89%, repitiéndose el mismo valor para el fitoplasma STRAWB1. Para el gen *rpsC*, el ORF putativo esta comprandido entre los nucleótidos 507-1258 (251aa), el cual codifica a una proteína con un peso molecular estimado de 28.42 kDa. Comparado con el mismo ORF de los fitoplasmas MPV y STRAWB1, presentan la misma longitud y pesos moleculares similares (Tabla 6.2). Respecto de la secuencia aminoacídica del gen *rpsC*, los valores de identidad hallados fueron de 94,42% y 96,02% respecto de la secuencia de los fitoplasmas MPV y STRAWB1 respectivamente.

Tabla 6.2: Marcos abiertos de lecturas (ORF) para los genes *rpLV-rpsC* de los aislamientos secuenciado (se muestra solo 1 por ser todos exactamente iguales). a: marco abierto de lectura, b: cantidad de aminoácidos, c: peso molecular putativo.

| Fitoplasma | <i>rpLV-rpsC</i> (pb) | ORF <i>rpLV</i> | ORF <i>rpsC</i> |
|-----------------------|-----------------------|--|---|
| ChTYXIII (16SrXIII-C) | 1259 | 134-529 ^a /131 ^b /14,53 ^c kDa | 507 ^a -1258/251 ^b /28.42 ^c kDa |
| MPV (16SrXIII-A) | 1257 | 132-527/131/14,46 kDa | 505-1257/ 251/ 28,46 kDa |
| STRAWB1 (16SXIII-B) | 1279 | 145-540/131/14,43 kDa | 518-1273/251/25.55 kDa |

Gen *secA*

Para el cálculo de la similitud nucleotídica se eligieron secuencias disponibles en banco de datos pertenecientes al grupo 16SrXIII y de fitoplasmas de otros grupos 16Sr relacionadas. Entre los distintos aislamientos del fitoplasma ChTYXIII la identidad fue del 100%, por lo que se eligió la secuencia del aislamiento ChTYXIII-Mo3 como secuencia de referencia para el cálculo de los valores de similitud con otros fitoplasmas. El valor más alto de similitud fue hallado con la secuencia del fitoplasma MPV (16SrXIII-A) (94.26%), seguidos por los fitoplasmas “*Candidatus Phytoplasma asteris*” (81.46%), “*Candidatus. Phytoplasma australiense*” y Strawberry Lethal Yellows (84.33%). Respecto a la identidad aminoacídica los valores de identidad calculados fueron de 88.24% (*Ca. Phytoplasma asteris*), 90.85% (*Ca. Phytoplasma australiense*, SLY) y 95.42% (MPV).

3.5.2 Patrones RFLP *in silico*

Gen 16S rDNA

Se obtuvieron los patrones RFLP putativos con las 17 enzimas propuestas en los sistemas de clasificación para fitoplasmas y se calculó el valor del coeficiente de similitud RFLP (F) con cada una de las cepas patrón (Tabla 6.4). Todos los aislamientos en estudio del ChTYXIII presentaron el mismo patrón RFLP (F=1), a excepción del aislamiento ChTYXIII-It27. El aislamiento ChTYXIII-It27 se diferenció del resto por el patrón generado por la enzima *AluI* (Figura 6.3), ya que en la posición 5'-849---852-3' presentó la secuencia AGCT (palíndromo de reconocimiento de la enzima *AluI*), mientras que el resto de los aislamientos presenta la secuencia AGTT, es por ello que el valor de F fue de 0.97. Comparados con la secuencia de los fitoplasmas ChTYXIII-4 y -72 se obtuvo un valor de F=1. Comparados con la secuencia patrón de los subgrupos descritos para el subgrupo 16SrXIII, se obtuvieron los mayores valores de similitud respecto al subgrupo 16SrXIII-C (F=0.95), a excepción del aislamiento ChTYXIII-It27 el cual mostró el mayor valor (F=0.94) respecto del subgrupo 16SrXIII-A.

Tabla 6.3: Valores del coeficiente de similitud RFLP (F) de cada uno de los aislamientos del fitoplasma ChTYXIII respecto a la secuencia patrón de cada uno de los subgrupos 16SrXIII. 1: fitoplasma Mexican periwinkle virescence MPV (AF248960); 2: fitoplasma STRAWB1 (U96614); 3: fitoplasma China Berry yellows CbY1 (AF495882); 4: fitoplasma Mexican potato purple top phytoplasma SINPV (FJ914647), 5: fitoplasma Papaya apical curl necrosis PACN-Br1(JQ792171) y 6: fitoplasma Strawberry red leaf StrawRL-Tc1 (KJ921641).

| Aislamiento/subgrupo | 16SrXIII-A ¹ | 16rXIII-B ² | 16SrXIII-C ³ | 16SrXIII-D ⁴ | 16SrXIII-E ⁵ | 16SrXIII-F ⁶ |
|----------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| ChTYXIII-Mo3 | 0.91 | 0.90 | 0.95 | 0.87 | 0.83 | 0.80 |
| ChTYXIII-RS3 | 0.91 | 0.90 | 0.95 | 0.87 | 0.83 | 0.80 |
| ChTYXIII-Ce3 | 0.91 | 0.90 | 0.95 | 0.87 | 0.83 | 0.80 |
| ChTYXIII-Ya4 | 0.91 | 0.90 | 0.95 | 0.87 | 0.83 | 0.80 |
| ChTYXIII-It27 | 0.94 | 0.87 | 0.91 | 0.84 | 0.87 | 0.83 |

Cuando se comparan los patrones RFLP *in silico* de los distintos aislamientos del fitoplasma ChTYXIII (tanto los descritos en esta tesis, como aquellos descritos en trabajos anteriores) respecto de la secuencia del fitoplasma CbY1 (secuencia referencia del subgrupo 16SrXIII-C), se observa que existen diferencias en el patrón de corte de las enzimas *MseI* y *HaeIII* (Figura 6.3). El aislamiento ChTYXIII-It27 presenta además un patrón diferencial en el corte generado con la enzima *AluI*, respecto de la secuencia del fitoplasma CbY1 (Figura 6.4). Estos resultados estarían indicando que los aislamientos del fitoplasma ChTYXIII conformarían un nuevo subgrupo, cercanamente emparentado al subgrupo 16SrXIII-C. Se deben entonces establecer las relaciones filogenéticas para aseverar dicha hipótesis.

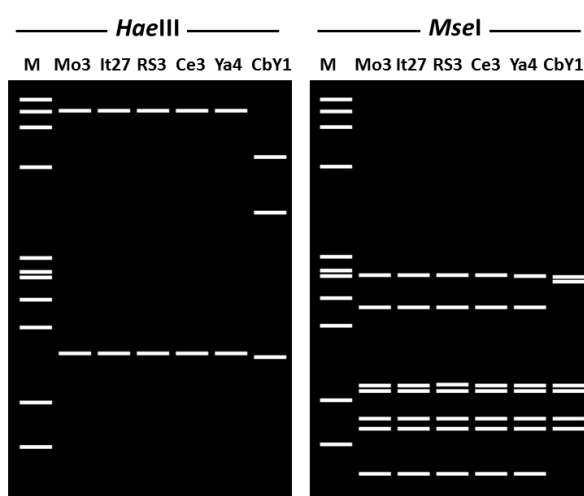


Figura 6.3: Patrones RFLP *in silico* del fragmento de 1.2kb (gen 16S rDNA) digeridos con las enzimas *HaeIII* y *MseI*. Mo3, It27, RS3, Ce3 y Ya4: aislamientos del ChTYXIII; CbY1: secuencia referencia del subgrupo 16SrXIII-C. M: marcador de peso molecular: Φ 174 digerido con la enzima-*HaeIII*.



Figura 6.4: Patrones RFLP *in silico* del fragmento de 1.2kb (gen 16S rDNA) digeridos con la enzima *AluI*. Mo3, It27, RS3, Ce3 y Ya4: aislamientos del ChTYXIII; CbY1: secuencia referencia del subgrupo 16SrXIII-C; MPV: secuencia referencia del subgrupo 16SrXIII-A; M: marcador de peso molecular: Φ 174-digerido con la enzima *HaeIII*.

Genes *rplV-rpsC*

Para el análisis de los patrones PCR-RFLP de la secuencia de los genes *rplV-rpsC* se empleó el software PDRAW32 (www.acaclone.com). Se compararon las secuencias de todos los aislamientos en estudio y las de los fitoplasmas MPV (16SrXIII-A) y STRAWB1 (16SrXIII-B). Después de analizar los patrones generados con las 17 enzimas propuestas para el gen 16S rDNA, se demostró que 5 enzimas (*BstUI*, *HaeIII*, *HhaI*, *MseI* y *TaqI*) generan un patrón único para cada uno de los subgrupos 16SrXIII (Figura 6.5), 4 enzimas (*AluI*, *HinfI*, *HpaII* y *RsaI*) muestran un patrón único en al menos 1 de los subgrupos, mientras que las 8 restantes (*BamHI*, *BfaI*, *EcoRI*, *HpaI*, *KpnI*, *DraI*, *Sau3AI* y *SspI*) no exhiben diferencias. Todos los aislamientos del fitoplasma ChTYXIII presentaron el mismo patrón RFLP para las 17 enzimas ensayadas.

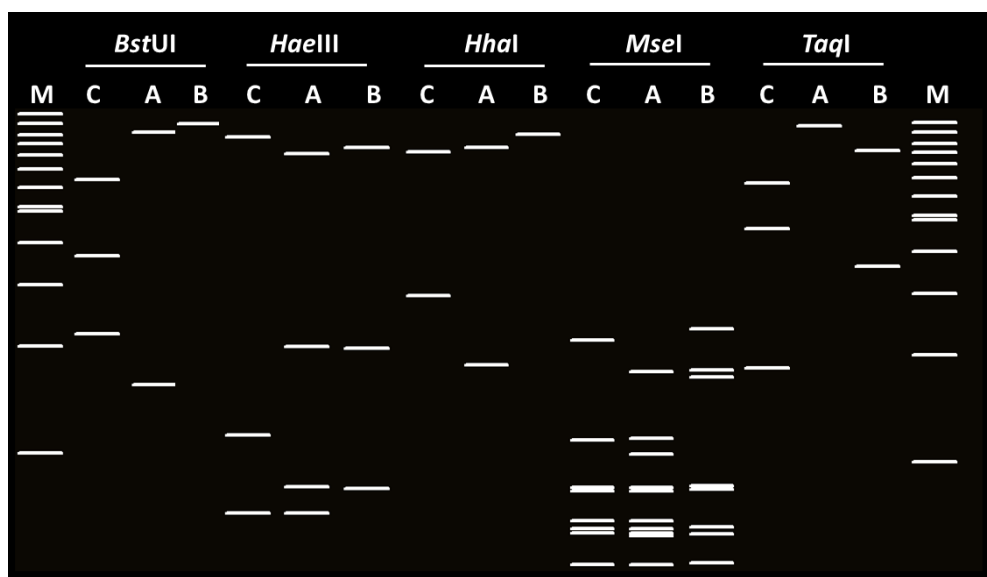


Figura 6.5: Patrones RFLP *in silico* de la secuencia completa de los genes *rpLV-rpsC* digerido con las enzimas de restricción que permiten diferenciar los fitoplasmas ChTYXIII (16SrXIII-C) (aislamiento ChTYXIII-Mo3, en representación del resto) (C), MPV (16SrXIII-A) (A) y STRAWB1 (16SrXIII-B) (B). M= marcador de peso molecular.

3.5.3 Análisis filogenético

Gen 16S rDNA

El árbol filogenético generado agrupó a la secuencia de los distintos aislamientos del fitoplasma ChTYXIII dentro de un mismo clado conjuntamente con las secuencias de los fitoplasmas del grupo 16SrXIII (boot=921) (Figura 6.6). Dentro de este clado, las secuencias del fitoplasma ChTYXIII formaron un grupo particular conjuntamente con las secuencias de los fitoplasmas CbY1, ChTYXIII-4 y ChTYXIII-72 (boot=961), claramente separado del resto de las secuencias del grupo 16SrXIII. Este agrupamiento resulta congruente con los resultados obtenidos mediante el análisis de la similitud de la secuencia y de los patrones RFLP *in silico*. Si bien los aislamientos del fitoplasma ChTYXIII descritos en esta tesis, así como los descritos en trabajos previos (ChTYXIII-4 y -72), presentan un valor de $F=0.95$, lo que según los sistemas de clasificación actuales determinaría que se trata de un nuevo subgrupo, el hecho de mostrar una relación filogenética estrecha, afectar al mismo hospedante y estar distribuidos exclusivamente en Sudamérica, estaría indicando que se trata de variantes del subgrupo 16SrXIII-C. La suma de estas características, a saber: i) hospedante único; ii) distribución exclusivamente sudamericana; iii) patrones RFLP que lo diferencian del

resto de los grupos/subgrupos descritos hasta el momento iv) porcentaje de identidad nucleotídica menor al 97,5% respecto del resto de los ‘Ca. Phytoplasmas’ descritos hasta el momento v) una filogenia que lo acerca más a sus pares del grupo 16SrXIII que con el resto de las especies (“*Candidatus Phytoplasma sp.*”) de fitoplasmas descritas, permiten proponer al fitoplasma *China tree yellows* (16SrXIII-C) y todas sus variantes como una nueva especie, aún no descrita de manera oficial. En este caso se propone asignarle el nombre de “*Candidatus Phytoplasma meliae*” en relación al hospedante exclusivo.

Descripción del ‘*Candidatus Phytoplasma meliae*’

- ❖ “*Candidatus Phytoplasma meliae*” (*meliae*: del género *Melia*, por su hospedante natural *Melia azedarach*)
- ❖ Nombre y acrónimo del fitoplasma: *China tree yellows* (ChTYXIII)
- ❖ Uno de los agentes etiológicos de la enfermedad conocida como amarillamiento letal o declinamiento del paraíso *M. azedarach*.
- ❖ Distribución sudamericana (Argentina, Bolivia, Paraguay).
- ❖ Aislamiento referencia para los genes 16SrDNA, rpLV-rpsC y secA ChTYXIII-Mo3 (Montecarlo, Misiones-Argentina). Aislamientos relacionados, ChTYXIII-RS3., ChTYXIII-Ya4, ChTYXIII-It27, ChTYXIII-Ce3 (Argentina, esta tesis); ChTYXIII-4 y ChTYXIII-72 (Argentina, Arneodo et al., 2007) y CbY1 (Bolivia, Harrison et al., 2003).
- ❖ Se cuenta con aislamientos en *Melia azedarach* y *Catharanthus roseus* en invernadero.

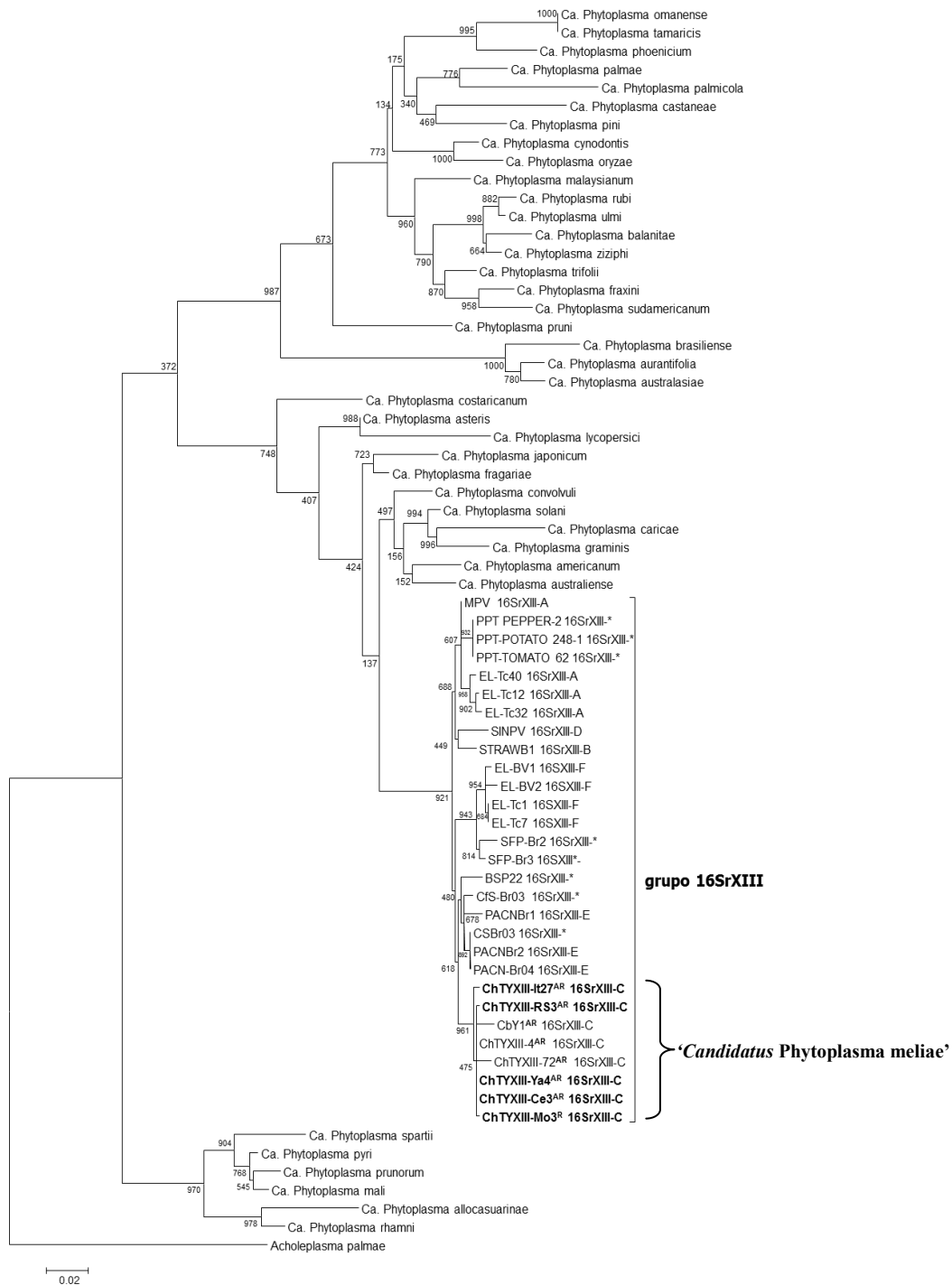


Figura 6.6: Árbol filogenético construido a partir de la secuencia parcial (1.2kb) del gen 16S rDNA mediante el método de Maximum-Likelihood. Se empleó la secuencia de los 38 “*Ca. Phyplamas sp*” descritos hasta el momento, 24 de fitoplasmas del grupo 16SrXIII y *Acholeplasma palmae* como extragrupo. Cada nodo presenta el valor de bootstrap (1000 réplicas). En negro las secuencias del fitoplasma ChTYXIII descritas en esta tesis. El número de acceso al GenBank de cada secuencia se describe en el Anexo (Ver Tabla 2). R: secuencia referencia del “*Ca. Phytoplasma meliae*”, AR: aislamientos relacionados.

Genes rpLV-rpsC

El árbol filogenético generado a partir de la secuencia de los genes rpLV-rpsC, agrupó las secuencias del fitoplasma ChTYXIII dentro de un mismo clado junto con la secuencias de los fitoplasmas MPV y STRAWB1, todos del grupo 16SrXIII (boot=1000) y separado del resto de las especies analizadas (Figura 6.7). Dentro de este, las secuencias del ChTYXIII forman un clado particular soportado por un alto valor de bootstrap (998). Respecto del resto de las especies de fitoplasmas se observa, igual que para el gen 16S rDNA, una relación cercana con las especies “*Candidatus Phytoplasma asteris*”, *Candidatus Phytoplasma solani*”, *Candidatus Phytoplasma australiense*”, *Candidatus Phytoplasma fragariae*” y *Candidatus Phytoplasma americanum*”, con las que conforman un clado monofilético. Estos resultados siguen aportando elementos que le dan mayor soporte a la designación del fitoplasma ChTYXIII como una nueva especie.

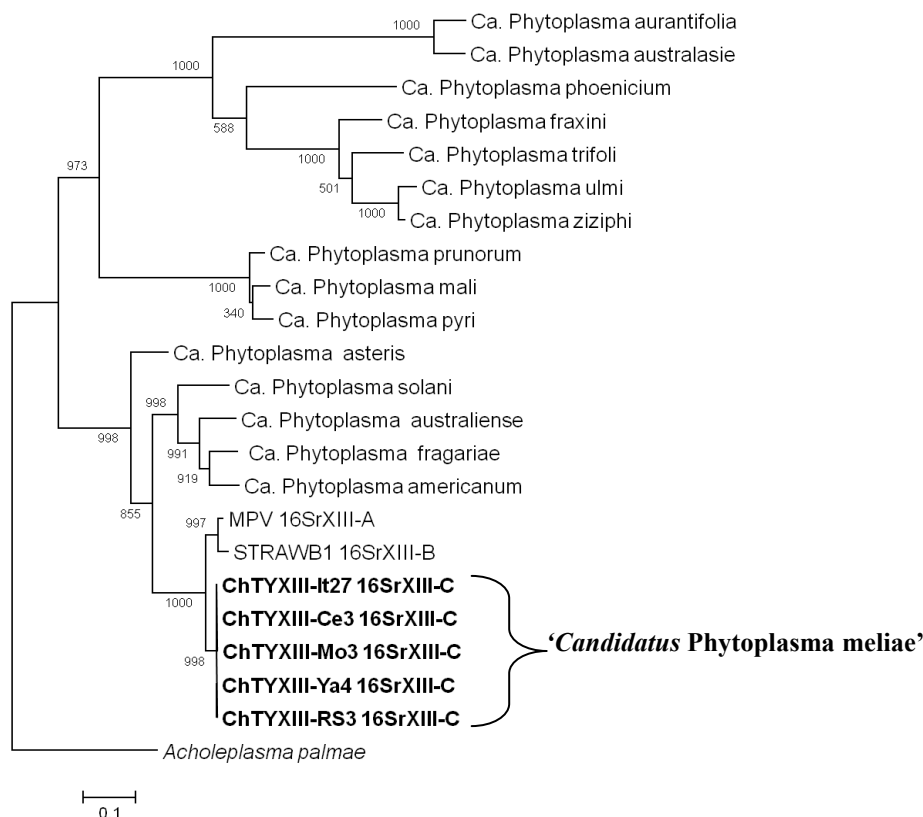


Figura 6.7: Árbol filogenético construido a partir de la secuencia (1.3kb) de los genes rpLV-rpsCA construido bajo el método de Maximum-Likelihood. Se empleó la secuencia de 15 “*Ca. Phyplamas sp.*”, 2 de fitoplasmas del grupo 16SrXIII y *Acholeplasma palmae* como extragrupo. Cada nodo presenta el valor de bootstrap (1000 réplicas). En negro las secuencias del fitoplasma ChTYXIII descritas en esta tesis. El número de acceso al GenBank de cada secuencia se describe en la tabla Anexo (ver Tabla 8).

Gen secA

El número de secuencias disponibles del gen SecA en bancos de datos es sustancialmente menor, y solo ha sido posible utilizar una secuencia del grupo 16SrXIII en la reconstrucción filogenética. El árbol filogenético agrupó a todas las secuencias del fitoplasma ChTYXIII dentro de un mismo clado (boot=615) conjuntamente con la secuencia del fitoplasma MPV (Figura 6.8). Respecto al resto de los fitoplasmas, y de manera congruente con los genes anteriormente analizados, vemos que tanto el fitoplasma MPV como el ChTYXIII conforman un clado monofilético con la secuencia de fitoplasmas del grupo 16SrXII y 16SrI. Estos datos aportan aún más evidencia acerca de la designación del fitoplasma ChTYXIII como una nueva especie de fitoplasmas.

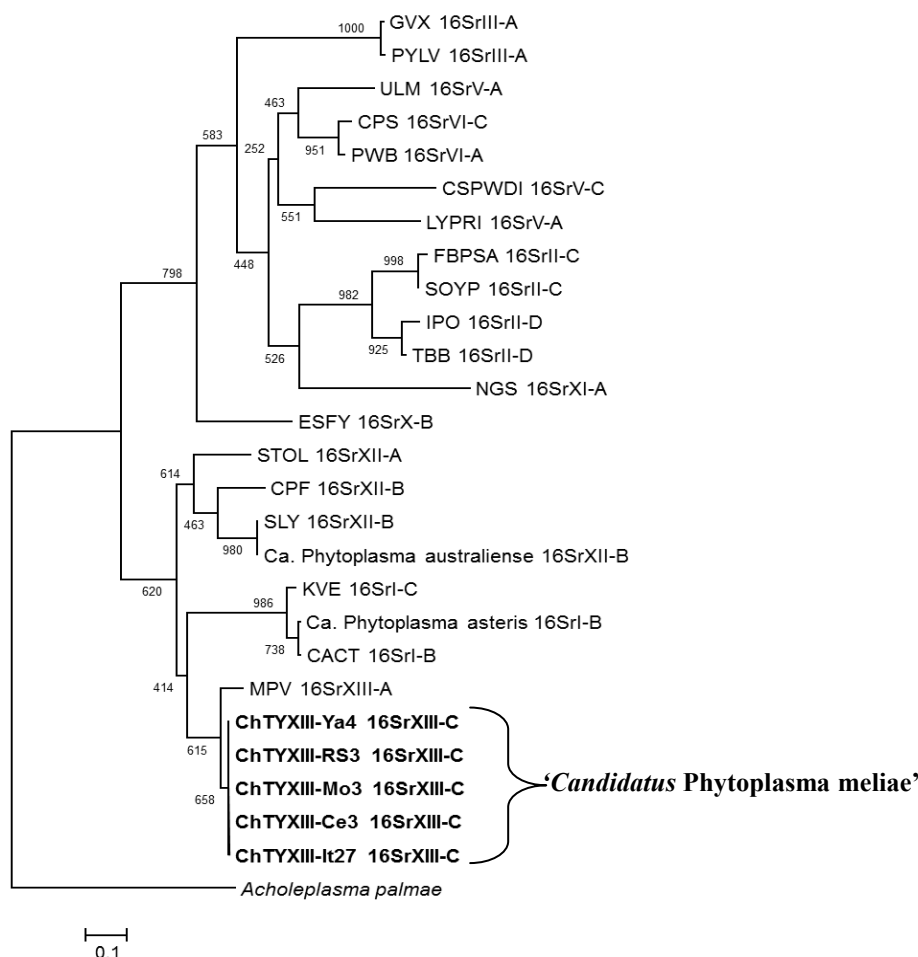


Figura 6.8: Árbol filogenético construido a partir de la secuencia (0.6kb) del gene secA construido bajo el método de Maximum-Likelihood. Se empleó la secuencia de 21 fitoplasmas y *Acholeplasma palmae* como extragrupo. Cada nodo presenta el valor de bootstrap (1000 réplicas). En negro las secuencias del fitoplasma ChTYXIII descritas en esta tesis. El número de acceso al GenBank de cada secuencia se describe en la tabla Anexo (ver Tabla 9)

3.6 Análisis de regiones relacionadas con mecanismos de patogenicidad: genes *imp* y *amp*

3.6.1 Gen *imp*

3.6.1.1 Amplificación mediante PCR, clonado y secuenciación

A partir de ADN de vinca infectada con el fitoplasma ACLL (16SrI-S) y empleando el juego de cebadores Rnc1-PssA1 (Kakizawa et al., 2009) (en mat y métodos pusiste esta cita para estos *primers*, no 2006a, por lo que deberías ser cuidadoso en cuanto a éste aspecto)) se logró amplificar una banda de 5kb (genes *rnc-dnaD-imp-pyrG-PssA*). Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 50µl conteniendo 1.5U de Dream® Taq polimerasa (Fermentas, Lituania), 0.4µM de cada primer, 100µM de dNTPs ,1X buffer Dream Taq (2mM MgCl₂). Las condiciones de amplificación puestas a punto se especifican en el Anexo. En el ADN de vinca sana se observaron algunas amplificaciones que no corresponden con el tamaño esperado (Figura 6.9). No se observaron amplificaciones del tamaño esperado en los aislamientos del fitoplasma ChTYXIII en ninguna de las condiciones ensayadas. El patrón de amplificaciones observadas se corresponde con el de planta sana, por lo que se deduce que dichos *primers* estarían hibridando sobre el ADN del hospedante de manera inespecífica, y que no son capaces de identificar el gen *imp* correspondiente en el ChTYXIII.

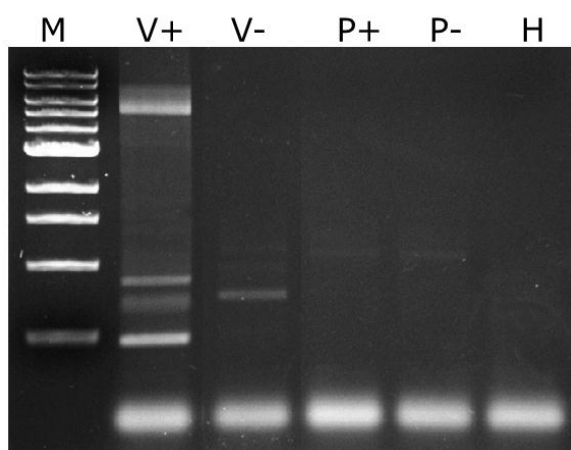


Figura 6.9: PCR empleando el juego de cebadores Rnc-1/PssA-1 para amplificar un fragmento genómico de 5kb que incluye al gen que codifica la proteína *imp*. V+: vinca infectada con el fitoplasma ACLL (16SrI-S); V-: vinca sana; P+: Paraíso infectado con el fitoplasma ChTYXIII; P-: Paraíso sano y H: control mezcla de reacción. M: marcador de peso molecular 1kb DNA ladder (NEB): 500, 100, 1500, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 8000, 10000pb.

Dados estos resultados, se procedió al diseño de *primers* degenerados en base a la secuencia de los genes flanqueantes *dnaD* y *pyrG*. A partir de la secuencia de los fitoplasmas “*Ca. Phytoplasma asteris*” OY-M (16SrI-B), “*Ca. Phytoplasma australiense*” (16SrXII-B), Strawberry lethal yellows (16SrXII-B) se logró identificar

zonas propicias para la hibridación de cebadores. Se diseñaron 2 cebadores que hibridan en el gen *pyrG* (reverse) y uno en el gen *dnaD* (forward) (Tabla 6.4) los que amplificarían fragmentos de 1500 y 2800pb (Figura 6.10).

Tabla 6.4: Principales características de los *primers* diseñados para amplificar un fragmento genómico que contenga la proteína *imp*.

| primer | secuencia (5'-3') | Tm | %GC |
|-----------------|------------------------------|---------|-------|
| dnaD-Fw1 | YGA AGATGGYTT TTRCW RRTAGA A | 53.2 °C | 34% |
| pyrG-Rv1 | GWATCACTGCTGCTTCTATTG | 51.3 °C | 42.9% |
| pyrG-Rv2 | GACATCGTCATCGTTTYGAR | 52.1°C | 45% |

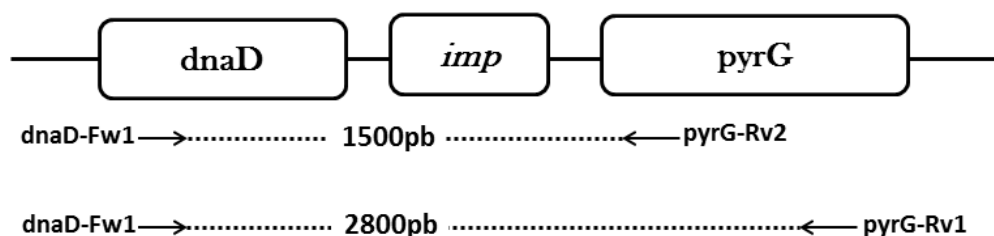


Figura 6.10: Diagrama donde se muestran los sitios de hibridación de los *primers* (flechas) diseñados para la amplificación de un fragmento genómico que contiene el gen que codifica la proteína *imp*. Se observan los productos de amplificación (líneas punteadas) de cada una de las combinaciones de *primers* empleados.

Bajo condiciones ajustadas de PCR (ver Anexo) fue posible amplificar una banda de 1.5kb (combinación de *primers* *dnaD-Fw1/pyrG-Rv2*) a partir de ADN de vinca-ACLL. No se observaron amplificaciones en ninguna de las condiciones ensayadas cuando se empleó ADN de vinca-ChTYXIII (Figura 6.11) ni tampoco en los controles sanos. Para la combinación *dnaD-Fw1/pyrG-Rv2* no fue posible amplificar bandas del tamaño esperado en ninguna de las condiciones ensayadas.

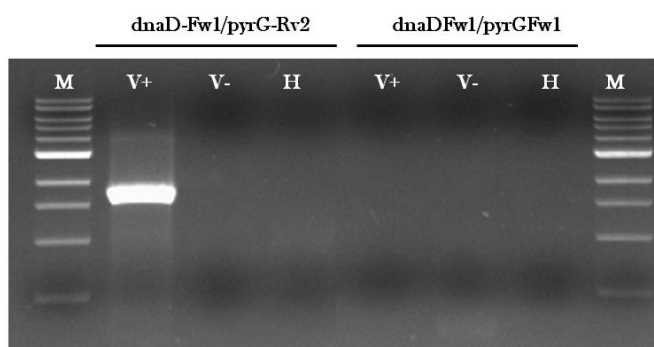


Figura 6.11: Amplificaciones de PCR empleando los juegos de *primers* *dnaD-Fw1/pyrG-Rv2* y *Rv1*. V+: vinca infectada con el fitoplasma ACLL (16SrI-B), V-: vinca sana, H: control mix de reacción, M: marcador de peso molecular 1kb DNA ladder (NEB).

No haber conseguido amplificar el fragmento genómico en ninguna de las combinaciones posibles empleando ya sea ADN de paraíso o de vinca infectados con el fitoplasma ChTYXIII, estaría indicando o bien que dicho gen no se encuentra en el genoma del fitoplasma estudiado o quizás este pueda tener una arquitectura distinta (genes flanqueantes) de modo que los *primers* no logran hibridar correctamente. Para dilucidar esta hipótesis sería necesario conocer el genoma completo del organismo y hacer una búsqueda completa para establecer si el gen *imp* en cuestión, está presente en este patógeno.

Para comprobar la identidad del fragmento amplificado a partir del ADN del fitoplasma ACLL, el mismo fue clonado y secuenciado según se describe en 2.4.2 El análisis de las secuencias resultantes permitió identificar el marco abierto de lectura (parcial) de la proteína *imp* del fitoplasma ACLL. La secuencia aminoacídica resultante (141aa) se analizó mediante BLASTp (NCBI) con el objetivo de identificar secuencias homólogas en banco de datos. Este análisis demostró, que la secuencia parcial de la proteína *imp*-ACLL presenta un valor de similitud del 100% respecto de la secuencia del mismo gen del fitoplasma *Onion yellows* (grupo 16SrI) (WP_011160959) lo que confirma que la secuencia amplificada se corresponde efectivamente al producto esperado y la filiación del ACLL.

3.6.2 Gen *amp*

3.6.2.1 Amplificación mediante PCR, clonado y secuenciación

Se trabajó con dos juegos de cebadores citados previamente: ES-1/nad-2 (amplicon de 3.6kb) (Kakizawa et al., 2006b) y el juego Stgro-F1/PAUnadR1 (amplicon de 2.2kb) (Fabre et al., 2011). Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 50 μ l conteniendo 1.5U de Dream® Taq polimerasa (Fermentas, Lituania), 0.4 μ M de cada primer, 100 μ M de dNTPs ,1X buffer Dream Taq (2mM MgCl₂). Las condiciones de amplificación se especifican en el Anexo. Se empleó como molde tanto ADN de vinca enferma con el fitoplasma ACLL (control), como vinca y paraíso enfermo con el fitoplasma ChTYXIII y los respectivos controles sanos. Ya sea empleando las condiciones originales propuestas por los autores, como las variaciones propuestas en esta tesis no se logró amplificar bandas del tamaño esperado en ninguno de los

materiales probados. Dado esto se procedió con el diseño de *primers* degenerados basados en la secuencia de los genes flanqueantes *groEL* (primer Forward) y *nadE* (primer Reverse), tal como fue desarrollado en MyM. Basándonos en el alineamiento múltiple de la secuencia de los genes *groEL-amp-nadE* de los fitoplasmas “*Ca. Phytoplasma asteris*” OY-M (16SrI-B), “*Ca. Phytoplasma australiense*” (16SrXII-B), Strawberry lethal yellows (16SrXII-B) se logró identificar zonas propicias para la hibridación de los *primers*. Se diseñaron 2 cebadores que hibridan en el gen *nadE* (reverse) y dos en el gen *groEL* (forward) (Tabla 6.5) que amplifican putativamente fragmentos de entre 2.3 y 3.3kb dependiendo de la combinación de los mismos (Figura 6.12).

Tabla 6.5: características de los cebadores diseñados para amplificar un fragmento genómico que contenga la secuencia del gen *amp*.

| cebador | secuencia (5'-3') | Tm | %GC |
|------------------|--------------------------------|--------|-------|
| groEL-Fw1 | GCR ATW GAY KYA GGR GCH AAT CC | 57.7°C | 51% |
| groEL-Fw2 | AGA YGC TCT TAA YGC WAC YA | 52.3°C | 42.5% |
| nadE-Rv1 | AAC CRC CKA TTT GTT TGC GWG | 56.6% | 47.6% |
| nadE-Rv2 | ATG AGC GCC ATT TAA AGC CAT | 55.5% | 42.9% |

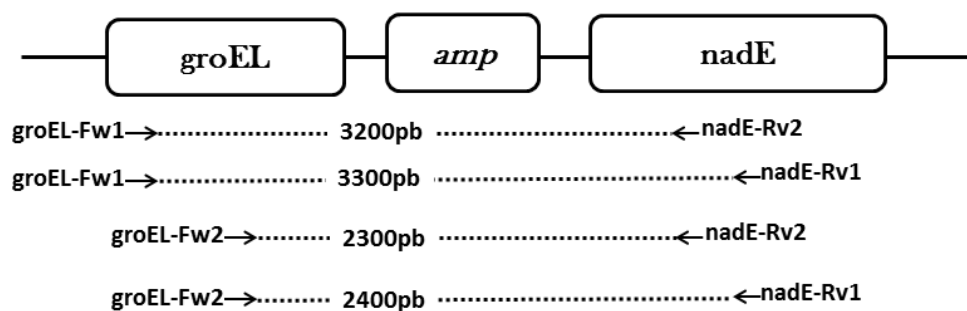


Figura 6.12: Diagrama donde se muestran los sitios de hibridación de los *primers* (flechas) diseñados para la amplificación de un fragmento genómico que contiene la proteína *amp*. Se muestran los productos amplificados (líneas punteadas) para cada una de las combinaciones de *primers*.

De las 4 combinaciones de primers ensayados la única que permitió amplificar fragmentos del tamaño deseado fue la combinación *groEL-Fw1/nadE-Rv2* (3.2kb). En los 5 aislamientos analizados se logró amplificar una fuerte banda de 3.2kb, además de un fragmento de aproximadamente 700pb. A partir de ADN de paraíso sano se observaron amplificaciones, pero distintas al tamaño esperado. No se observaron

amplificaciones de 3.300pb a partir de ADN de vinca infectada con el fitoplasma ACLL ni tampoco a partir de vinca sana (figura 6.13). Las condiciones ajustadas de amplificación se detallan en el Anexo.

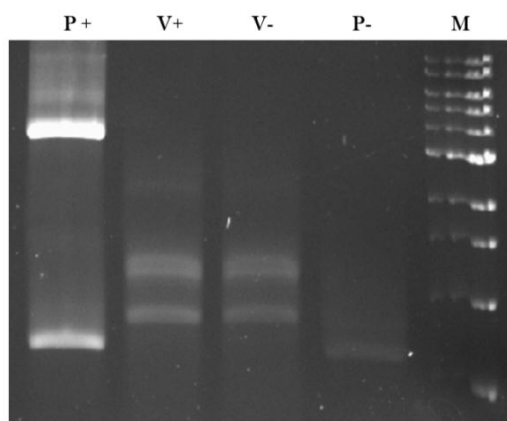


Figura 6.13: Amplificaciones de PCR empleando los juegos de *primers* groEL-Fw1/nadE-Rv2. P +: paraíso infectado con el fitoplasma ChTYXIII (aislamiento ChTYXIII-Mo3), V +: vinca infectada con el fitoplasma ACLL, V -: vinca sana, P -: paraíso sano, M: marcador de peso molecular 1kb DNAladder (NEB) 0.5, 1, 1.54, 2, 3,4, 5, 6, 8 y 10kb.

El fragmento de 3.2kb amplificado (aislamiento ChTYXIII-Mo3) se aisló desde el gel de agarosa, se clonó en el vector pGEM-T Easy (Promega, USA) y fue secuenciado desde ambos extremos (*primers* T7 y SP6). Se obtuvieron las secuencias parciales de los genes flanqueantes al gen de la proteína *amp*. Para el gen *groEL* se secuenciaron 788pb mientras que para el gen *nadE* se lograron secuenciar 825pb. La identidad de cada secuencia se comprobó analizando las mismas mediante BLASTn (NCBI). Los mayores valores de similitud para la secuencia del gen *groEL* fueron de entre 84-87% respecto a la secuencia el gen *groEL* de los fitoplasmas “*Ca. Phytoplasma japonicum*” (AB746432), “*Ca. Phytoplasma australiense*” (AM422018) y Strawberry lethal yellows (CP002548). Mientras que para la secuencia del gen *nadE* se obtuvo un valor de similitud del 82% respecto de la secuencia del gen *nadE* de los phytoplasmas “*Ca. Phytoplasma australiense*” (AM422018), Strawberry lethal yellows (CP002548) y “*Ca. Phytoplasma asteris*” (AM422018).

A partir de las secuencias obtenidas de cada extremo se volvieron a diseñar cebadores específicos del fitoplasma ChTYXIII para amplificar "hacia adentro" un nuevo fragmento de menor tamaño con la finalidad de conocer la secuencia del gen de la proteína *amp*. Se diseñó un nuevo juego de cebadores denominado groEL-ChTYFw1/nadEChTYRv1 (tabla 6.6), los cuales amplificarían un fragmento de 2.1kb aproximadamente.

Tabla 6.6: Características de los cebadores diseñados para amplificar un fragmento genómico que contenga la secuencia del gen *amp*, diseñados a partir de la secuencia parcial de los genes *groEL* y *nadE* del fitoplasma ChTYXIII.

| cebador | secuencia (5'-3') | Tm | %GC |
|---------------|------------------------|-------|-------|
| groEL-ChTYFw1 | GTAGGAGCTGCTATGACAGAAG | 54.7% | 50% |
| nadE-ChTYRv1 | CCTCTTGTAAGCCAAAGGCA | 55.6% | 47.6% |

Se logró amplificar un fragmento de aproximadamente 2.2kb a partir del ADN de los 5 aislamientos del fitoplasma ChTYXIII (Figura 6.14), además de un pequeño fragmento espurio cercano a las 100pb, mientras que no se observaron amplificaciones a partir de paraíso sano.

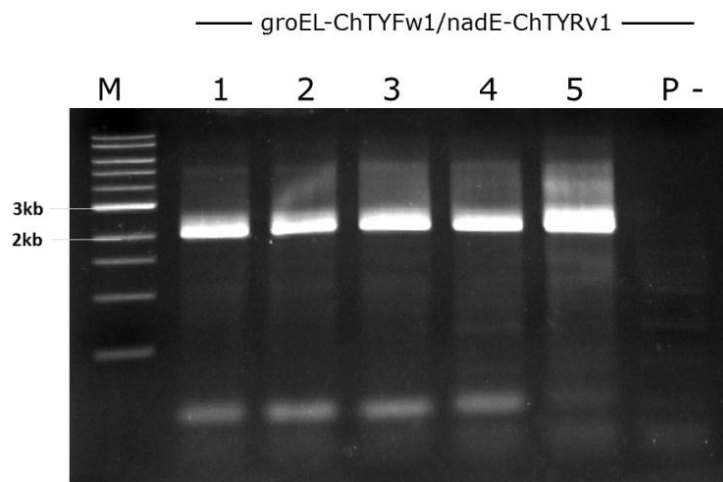


Figura 6.14: Productos de PCR amplificados mediante los *primers* específicos groEL-ChTYFw1/nadE-ChTYRv1. M1-5: aislamientos del fitoplasma ChTYXIII. 1: ChTYXIII-It27, 2: ChTYXIII-Ya4, 3: ChTYXIII-RS3, 4: ChTYXIII-Mo3 y 5: ChTYXIII-Ce3, P-: paraíso sano. M: marcador peso molecular 1kb DNA ladder (NEB) 0.5, 1, 1.5, 2, 3,4, 5, 6, 8 y 10kb.

Los fragmentos amplificados fueron clonados en el vector pGEMT Easy (Promega, USA) de la misma manera que para el fragmento de 3300bp anteriormente mencionado. Se seleccionó 1 clon de cada aislamiento para su secuenciación en Macrogen (Corea) empleando la estrategia de *primer walking*. Para poder conocer la totalidad de la secuencia del gen *amp*, fue necesario resecuenciar cada clon/aislamiento a partir de nuevos *primers* generados en la secuencia del gen *groEL* (Figura 6.15).

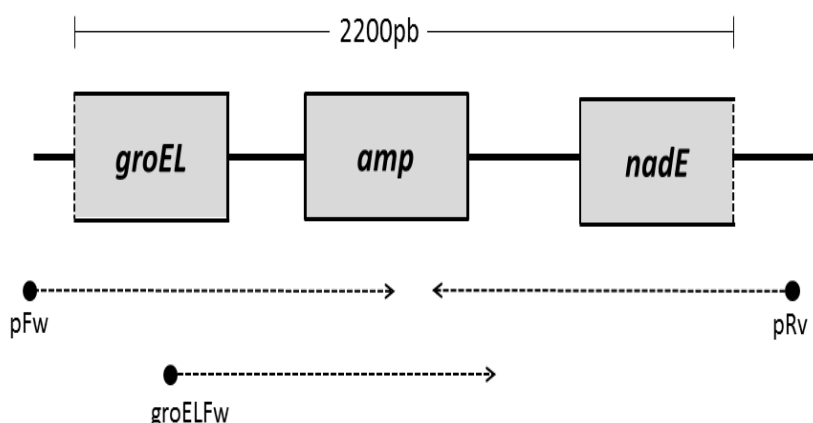


Figura 6.15: Esquema representativo del fragmento genómico clonado que contiene la secuencia del gen *amp*. El fragmento clonado (2kb) contiene la secuencia parcial de los genes *groEL* y *nadE*. El fragmento fue secuenciado desde ambos extremos empleando *primers* universales del plásmido (pFw/pRv). A partir de la secuencia parcial obtenida del gen *groEL* se diseñó un cebador específico (groELFw) para secuenciar desde este extremo y completar la secuencia del gen *amp*.

3.6.2.2 Análisis de la secuencia

Una vez ensambladas las secuencias se obtuvieron los contigs correspondientes a cada aislamiento. El tamaño de los contigs para cada aislamiento fue: ChTYXIII-Ce3 (1227pb), ChTYXIII-It27 (1968pb), ChTYXIII-Mo3 (2009pb), ChTYXIII-RS3 (2010pb) y ChTYXIII-Ya4 (1600pb). En los fragmentos secuenciados se detectó la presencia de un ORF (parcial) correspondiente al gen *groEL* (455pb), el ORF del gen *amp* (474pb) completo y un ORF incompleto correspondiente al gen *nadE*. En la secuencia del aislamiento ChTYXIII-Ce3 solo se hallaron los 2 primeros ORF. La organización de los genes responde a lo ya descrito en otros trabajos (Arashida et al, 2008) siendo la misma 5'-*groEL-amp-nadE*-3'. Según este estudio en el fitoplasma 16SrXIII-C el gen *amp* está separado del gen *groEL* por una región intergénica de 122pb (IGS1), mientras que del gen *nadE* por una región intergénica de 468pb (IGS2) (Figura 6.16). El contenido de GC promedio para los fragmentos clonados en todos los aislamientos fue de 26%, lo que se condice con lo registrado en otros trabajos (Kakizawa et al., 2006a). En la IGS1 se identificaron también las secuencias putativas de las señales de transcripción -10 (TGTTAAACT) y -35 (TTTAAG) y el sitio de unión a ribosoma (secuencia Shine Dalgarno AAAGGAA) en todos los aislamientos.

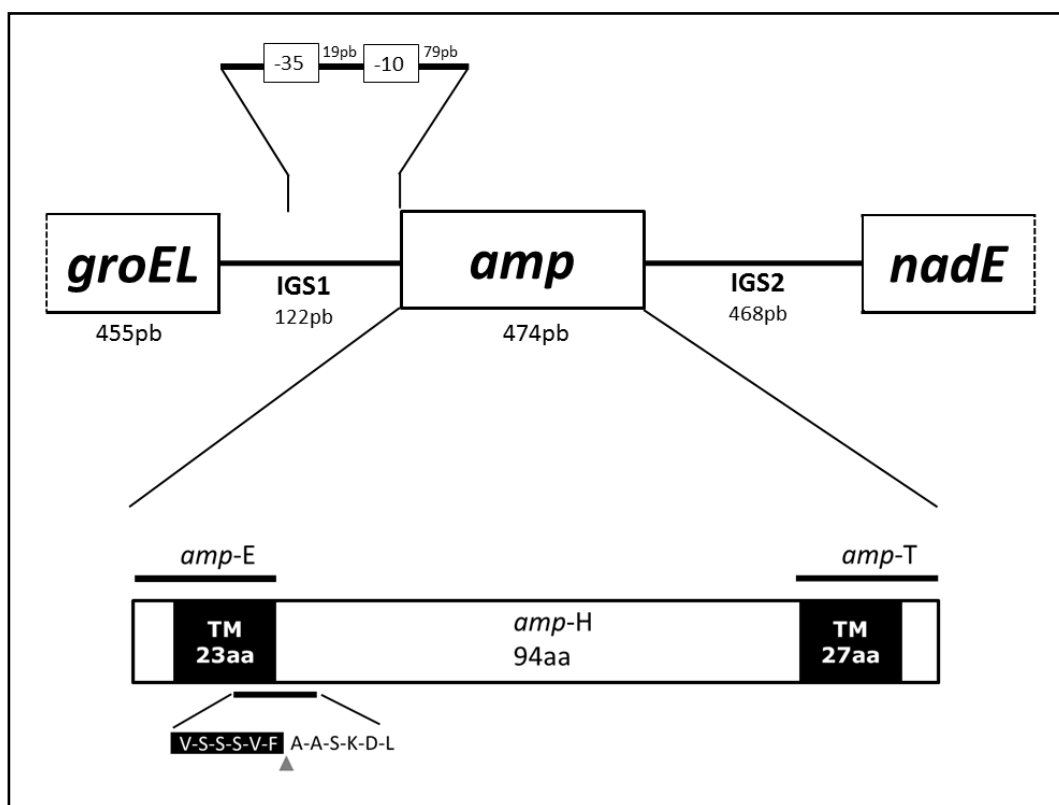


Figura 6.16: Representación esquemática los genes *groEL-amp-nadE* del fitoplasma ChTYXIII. -10, -35: posibles señales de transcripción, IGS1-IGS2: regiones intergénicas, *groEL*: gen de la chaperonina *groEL*, *amp*: gen de la proteína inmunodominante de membrana, *nadE*: gen para la NAD sintetasa. Se observa también una detalle de los distintos dominios que conforman a la proteína *amp*, *amp-E*: secuencia de exportación N-terminal, *amp-H*: dominio hidrofílico mayor y *amp-T*: dominio transmembrana/ pequeño fragmento C-terminal hidrofílico. En negro las regiones transmembrana predichas, el sitio de clivaje se observa en detalle (triángulo gris).

La secuencia aminoacídica deducida para la proteína *amp* fue de 158aa, con un pesomolecular estimado de 17.07kDa. En cuanto a su composición, la proteína *amp* es rica en residuos de alanina (12%), serina (12%), valina (13.9%) y lisina (14.6%). Se logró identificar los residuos correspondientes al péptido señal (1-35), y un sitio de clivaje de la proteína putativo entre los residuos 35-36 (Figura 6.17). Se identificaron también 2 regiones de transmembrana, una ubicada en el extremo N-terminal (péptido señal, *amp-E*) (residuos 13-35) y la otra en la región C-terminal (*amp-T*) (residuos 131-152) (Figura 6.18). La localización predicha por el programa pSORTb la ubica en la membrana citoplásmica (score=9.87, valores significativos >7,5).

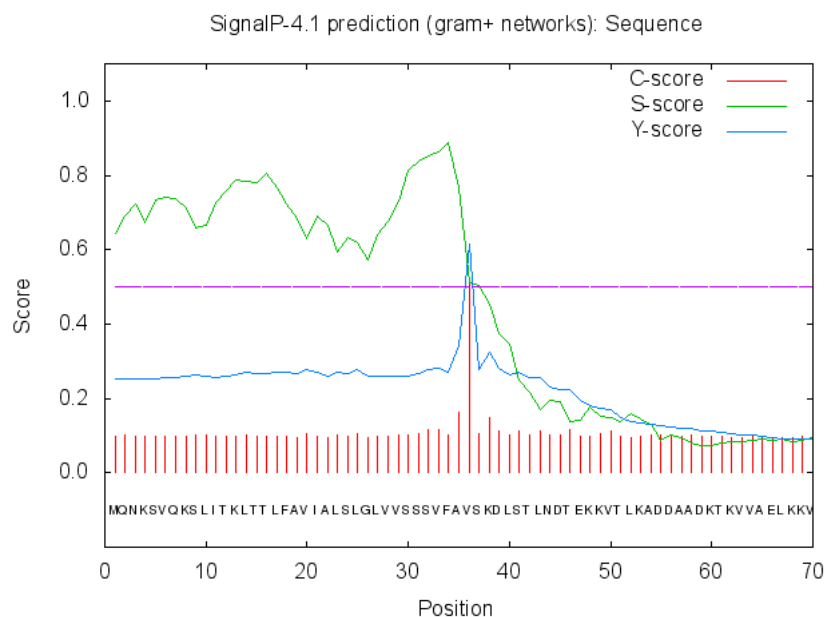


Figura 6.17: Gráfica en donde se muestra las probabilidades de presencia de un péptido señal en los primeros 70 residuos de la proteína *amp*. El péptido señal consiste en una secuencia de 35aa estando el sitio de clivaje entre los residuos 35-36. C-score (barras verticales rojas): puntuación del sitio *crudo* de escisión del péptido señal, el valor se hace notablemente alto en el residuo inmediatamente posterior al sitio de clivaje en la proteína madura, S-score (línea continua verde): puntuación del péptido señal, permite distinguir la secuencia correspondiente al péptido señal, por debajo de la línea de corte (línea punteada violeta) se considera que no pertenece a la secuencia del péptido señal; Y-score (línea continua azul): combina los dos anteriores y genera una mejor predicción del sitio de clivaje, mayores valores más probabilidades de encontrar un sitio de clivaje.

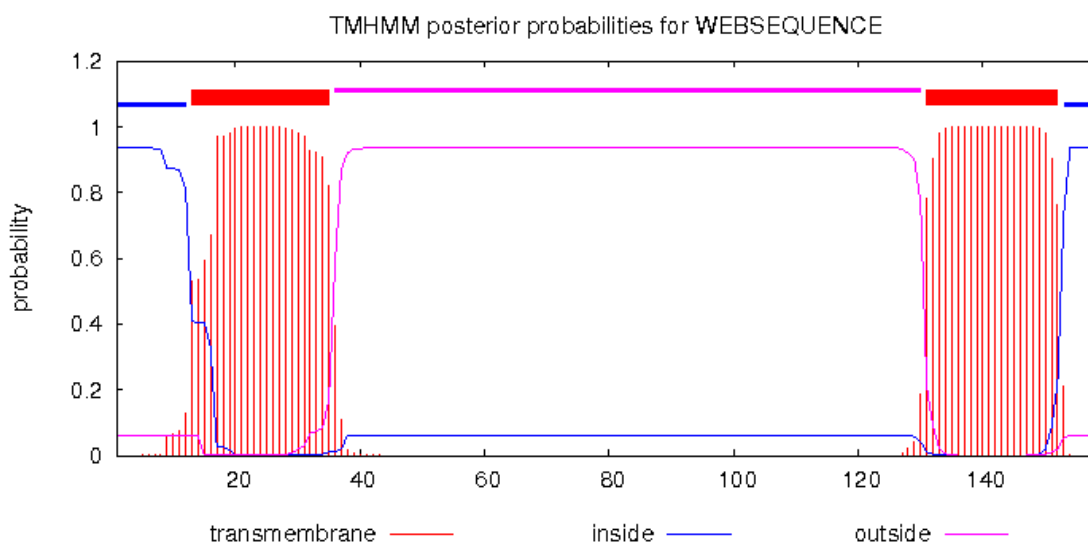


Figura 6.18: Gráfica en donde se muestra las probabilidades de presencia de regiones transmembrana en la proteína *amp*. En el eje de las Y: probabilidad posterior de ocurrencia de sitios transmembrana, eje X: residuos de la proteína *amp*. Línea azul: probabilidades de que los residuos estén localizados en el interior de la célula, línea rosa: probabilidad de que los residuos de la proteína se ubiquen por fuera de la célula, y barras verticales rojas: probabilidad de los residuos de estar incluidos dentro de la membrana. Entre los valores de 1 y 1.2 (probabilidad) se observan los segmentos de la proteína en cuestión y su ubicación putativa en función a los valores de probabilidad.

Para identificar la presencia de dominios conservados se analizó la secuencia aminoacídica de la proteína *amp* del fitoplasma ChTYXIII en el banco de datos (Conserved Domains Database, NCBI). Se logró identificar la presencia de un dominio conservado denominado Phyto-Amp (intervalo 1-113/ E-value: 4.44e-04) (Figura 6.19). Este dominio Phyto-Amp se define como una familia de proteínas inmunodominantes de membrana presentes en bacteria carentes de pared celular (Barbara et al., 2002; Galetto et al., 2011).

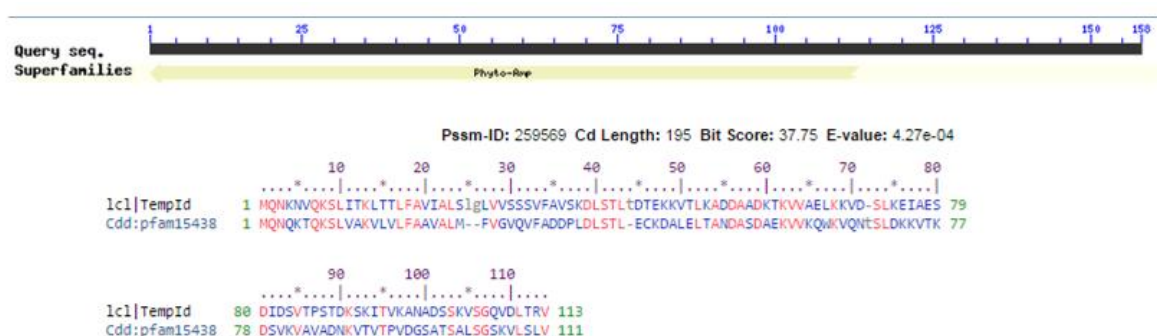


Figura 6.19: Dominio conservado Phyto-amp detectado en la secuencia de la proteína *amp* del fitoplasma ChTYXIII. La barra horizontal negra representa la secuencia de la proteína *amp*-ChTYXIII. Debajo se muestra el alineamiento entre la secuencia de referencia para la supermfamilia Phyto-Amp y la secuencia parcial de la proteína *amp* del fitoplasma ChTYXIII (captura de pantalla del sitio Conserved Domains Database NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)

Se analizó la secuencia aminoacídica de la proteína *amp*-ChTYXIII mediante BLASTp (database: nr) y se registraron valores de identidad de 40% con el “*Ca. Phytoplasma japonicum*” (BAG16385, e-value: 1e-26), de 40% con “*Ca. Phytoplasma solani*” (CBL82417, e-value: 6e-22), 34% con “*Ca. Phytoplasma australiense*” (WP_015638088, e-value: 1e-18) y 34% con “*Ca. Phytoplasma asteris*” (WP_011412878, e-value: 3e-13). Se realizó un alineamiento múltiple CLUSTALW (Figura 6.20), se calcularon los valores de identidad aminoacídica entre los 5 aislamientos del fitoplasma ChTYXIII y la secuencia de los fitoplasmas mencionados en el análisis de BLASTp. Los valores de identidad para la secuencia completa de la proteína *amp* fue de 96.84 a 98.73% entre los aislamientos del ChTYXIII. Comparados con otros fitoplasmas los valores de similitud variaron entre 39.10% y 41.03% con el fitoplasma “*Ca. Phytoplasma japonicum*”, entre 36.94% y 37.58% con el fitoplasma “*Ca. Phytoplasma solani*”, entre 35.37% y 37.41% con el fitoplasma “*Ca. Phytoplasma*

australiense”, y por último entre 26.58% y 29.11% con el fitoplasma “*Ca. Phytoplasma asteris*”.

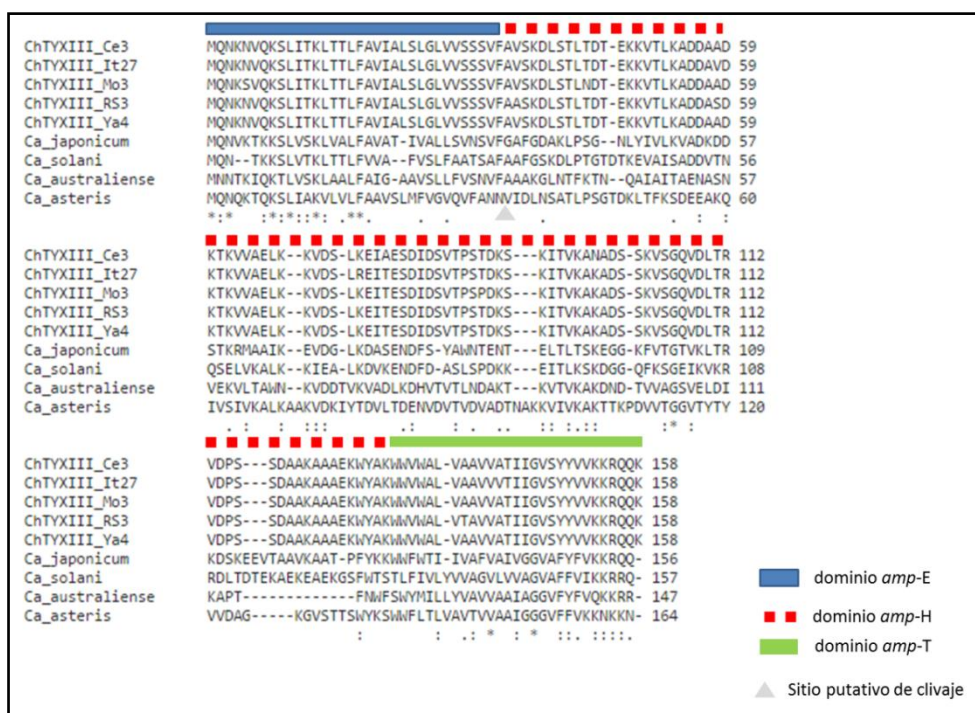


Figura 6.20: Alineamiento múltiple generado a partir de la secuencia aminoacídica de la proteína *amp* de los distintos aislamientos del ChTYXIII y fitoplasmas relacionados. Se delimitan los distintos dominios de la proteína.

Para un análisis más exhaustivo de la secuencia aminoacídica de la proteína *amp*, se determinaron los residuos correspondientes a las regiones *amp*-E (péptido señal), *amp*-H (dominio hidrofílico) y *amp*-T (extremo C-terminal) en la secuencia de los fitoplasmas “*Ca. Phytoplasma japonicum*”, “*Ca. Phytoplasma solani*”, “*Ca. Phytoplasma australiense*” y “*Ca. Phytoplasma asteris*” (Tabla 6.7). Luego, mediante CLUSTALW, se calcularon los valores de identidad aminoacídica. Los resultados demostraron que entre los distintos aislamientos del fitoplasma ChTYXIII el valor de identidad nucleotídica para la secuencia completa de la proteína *amp*, vario entre 96.84% y 96.98%. Por otro lado, los valores de similitud para región *amp*-E fueron de entre 97.14% y 100%, para la región *amp*-T de entre 96.43% y 100% mientras que para la región *amp*-H los valores fueron entre 95.79% y 97.89%. De aquí se observa que la región más variable es la que se corresponde con el dominio *amp*-H.

Tabla 6.7: Identidad aminoacídica de los distintos dominios de la proteína amp (E, H y T) de los aislamientos del fitoplasma ChTYXIII y sus ortólogos.

| aislamiento ChTYXIII | Dominio | <i>Ca. Japonicum</i> | <i>Ca. Solani</i> | <i>Ca. australiense</i> | <i>Ca. asteris</i> |
|----------------------|---------|----------------------|-------------------|-------------------------|--------------------|
| <i>ChTYXIII-Ce3</i> | amp-E | 44.12 | 45.16 | 47.06 | 40.62 |
| | amp-H | 27,37 | 25,26 | 27,06 | 16,84 |
| | amp-T | 53,85 | 37,04 | 40,74 | 39,29 |
| <i>ChTYXIII-It27</i> | amp-E | 44.12 | 45.16 | 47.06 | 40.62 |
| | amp-H | 27,37 | 25,26 | 27,06 | 16,84 |
| | amp-T | 50 | 37,04 | 37,04 | 42,86 |
| <i>ChTYXIII-Mo3</i> | amp-E | 44.12 | 41,94 | 47.06 | 40.62 |
| | amp-H | 27,37 | 27,37 | 27,06 | 16,84 |
| | amp-T | 53,85 | 37,04 | 40,74 | 39,29 |
| <i>ChTYXIII-RS3</i> | amp-E | 44.12 | 45.16 | 47.06 | 40.62 |
| | amp-H | 28,42 | 26,32 | 28,24 | 16,84 |
| | amp-T | 53,85 | 37,04 | 40,74 | 35,71 |
| <i>ChTYXIII-Ya4</i> | amp-E | 44.12 | 45.16 | 47.06 | 40.62 |
| | amp-H | 28,42 | 26,32 | 27,06 | 17,89 |
| | amp-T | 53,85 | 37,04 | 40,74 | 39,29 |

Comparando la secuencia de los aislamientos del fitoplasma ChTYXIII con otros fitoplasmas, los valores de similitud respecto a la secuencia completa de la proteína *amp* vario entre 28.42% y 18.64%. El análisis de la similitud de los distintos dominios arrojó valores entre 40.62% y 47.67 % para el dominio *amp*-E, entre 16.84% y 28.42% para el dominio *amp*-H y entre 35.81% y 53.85% para el dominio *amp*-H (Tabla 6.7). Estos resultados demuestran que la región más variable de la proteína *amp*, tanto intraespecíficamente como interespecíficamente, es el dominio *amp*-H.

Para el análisis de la presión de selección se empleó la secuencia nucleotídica de la proteína *amp* de los 5 aislamientos del ChTYXIII estudiados. En total se analizaron 474 (158 codones) posiciones en el dataset final. Los valores de dN-dS (estandarizados para poder ser comparables) para cada uno de los codones analizados se muestran en Anexo (Tabla 10). De los 158 codones analizados, 10 presentaron valores de dN-dS >0, es decir que estarían sujetos a una presión de selección positiva. De estos 10 codones, 6 están presentes en la región *amp*-H (región hidrofílica central), 3 en la región *amp*-T (C-terminal) y 1 en la región *amp*-E (tabla Anexa XX). Se realizó también el mismo análisis con dos set de datos de estudios poblacionales llevados a cabo con la proteína

amp en otras especies de fitoplasmas. El primer set de datos (compuesto por 9 secuencias) se corresponden con la proteína inmunodominante tipo amp *STAMP* (Fabre et al., 2011) caracterizada en diversos aislamientos europeos del fitoplasma STOLBUR. El otro set de datos (compuesto por 14 secuencias), se corresponde con la proteína tipo *amp*, caracterizada en diversos aislamientos del fitoplasma asteris y fitoplasmas relacionados a este último (Kakisawa et al., 2006). En ambos casos se calcularon los valores dN-dS (estandarizados para poder ser comparables), y su posición dentro de la secuencia. También, se describieron las distintas regiones (*amp-E*, *amp-H* y *amp-T*), a fin de poder realizar comparaciones con las mismas en la proteína amp del fitoplasma ChTYXIII. Para el caso de la proteína *STAMP*, de un total de 157 codones analizados, 17 presentaron valores de dN-dS > 0, ubicándose 2 en la región *amp-E*, 14 en la región *amp-H* y 1 en la región *amp-T*. Por su parte, la proteína *amp-asteris*, presentó un total de 65 codones (228 totales) con valores dN-dS > 0, ubicándose 2 en la región *amp-E*, 61 en la región *amp-H* y 2 en la región *amp-T*. Los resultados de dicho análisis, determinaron que el mayor número de codones con valores dN-dS > 0 se dio en la región *amp-H* (Figura 6.21), estando esta región sometida a una mayor presión de selección positiva.

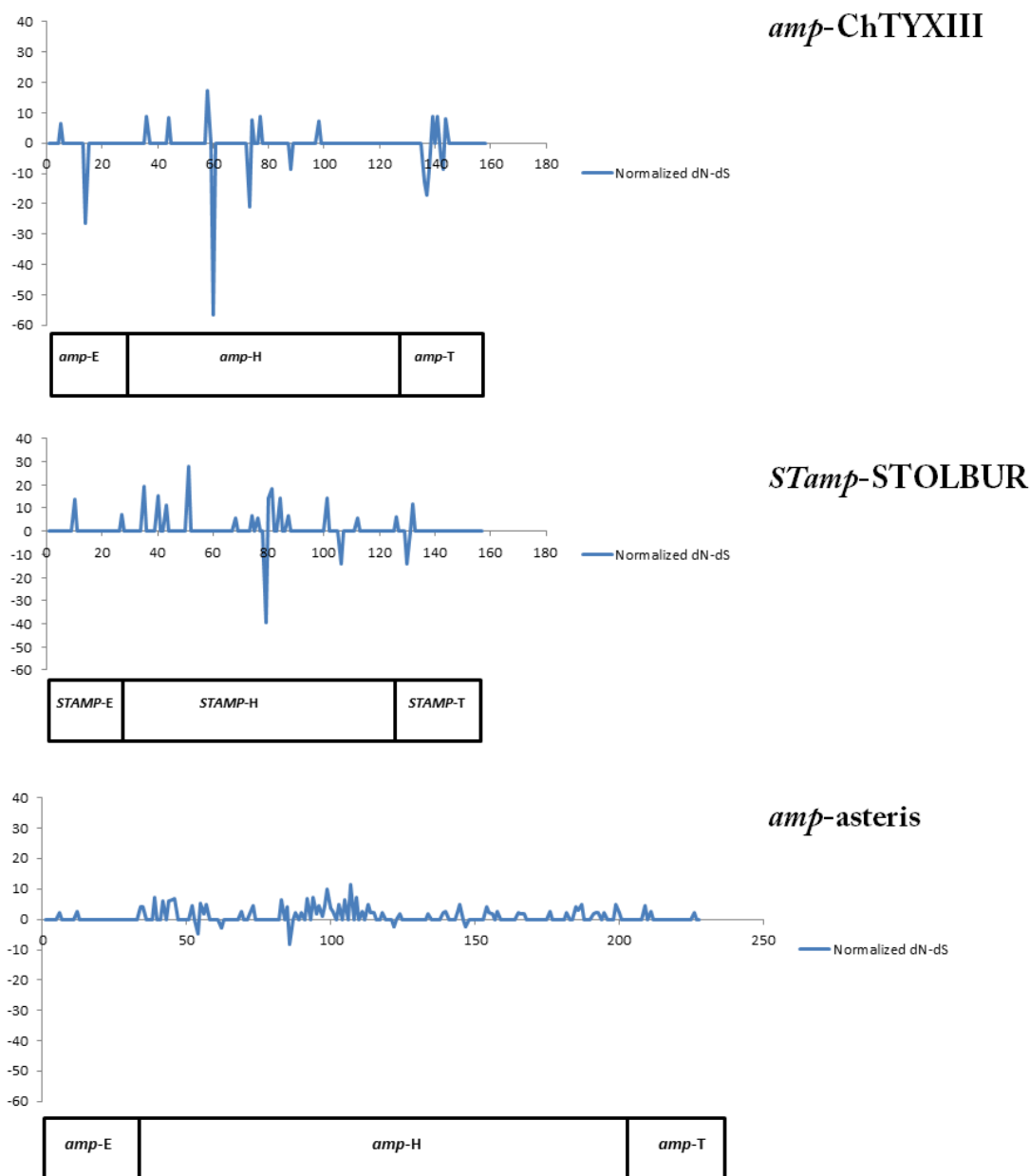


Figura 6.21: Presion de selección sobre los distintos dominios de la proteína *amp* en distintas especies de fitoplasmas. Se visualizan los resultados para 3 set de datos, *amp-ChTYXIII* (5 secuencias de aislamientos del fitoplasma ChTYXIII), *STamp-STOLBUR* (9 secuencias de aislamientos del fitoplasma STOLBUR) y *amp-asteris* (14 secuencias de aislamientos del fitoplasma asteris y fitoplasmas relacionados). En cada set de datos se grafica en el eje de las X, la posición del codón y en el eje de las Y el valor dN-dS estandarizado correspondiente a cada uno de esos codones. A su vez se visualizan los distintos dominios (E, H y T) de la proteína *amp* a escala respecto al eje X.

4. Discusión

En el presente capítulo se caracterizaron molecularmente regiones genómicas conservadas y regiones genómicas involucradas con mecanismos de interacción fitoplasma-hospedante, de distintos aislamientos geográficos del fitoplasma ChTYXIII, uno de los agentes etiológicos del *declinamiento del paraíso*. El análisis de los patrones PCR-RFLP globales de la secuencia del gen 16Sr DNA, asocio los aislamientos del fitoplasma ChTYXIII descritos en la tesis dentro del grupo 16SrXIII. Entre ellos comparten un 100 de similitud de sus patrones, a excepción del aislamiento ChTYXIII-It27 (Itatí, Corrientes) con el cual difieren en el patrón de la enzima *AluI*. Comparados con la secuencia del fitoplasma CbY1 (cepa referencia del subgrupo 16SrXIII-C) (Harrison et al., 2003) se observaron diferencias en el patrón de dos enzimas (*MseI* y *HaeIII*) con los aislamientos ChTYXIII-Ce3, -RS3, -Mo3 y -Ya4 y tres enzimas (*MseI*, *HaeIII* y *AluI*) con el aislamiento ChTYXIII-It27, generando valores de coeficiente de similitud RFLP (F) de 0.95 y 0.91 respectivamente. Según los criterios establecidos para la asignación de grupos y subgrupos 16Sr (Lee et al., 1998, Zhao et al., 2009a) valores de F (coeficiente de similitud RFLP) menores a 0.97 respecto a los miembros de un subgrupo dadosuponen la asignación de un nuevo subgrupo. Las diferencias encontradas con las enzimas *MseI* y *HaeIII* también fueron identificadas en las secuencias de los aislamientos ChTYXIII-4 y ChTYXIII-72, previamente descritos en Argentina (Arneodo et al., 2007). Sin embargo, en el análisis filogenético todas las secuencias relacionadas al subgrupo 16SrXIII-C formaron un clado monofilético, separado del resto de los fitoplasmas del grupo 16SrXIII. Estos resultados sugieren entonces que podría tratarse de aislamientos de la misma especie de fitoplasma o variantes del subgrupo lo que sumado al hecho de no haberlo localizado en otro hospedante más que paraíso y con un rango de distribución exclusivamente sudamericana otorgan más fuerza a dicha hipótesis. En función a los criterios establecidos para la taxonomía de organismos no cultivables, como es el caso de los fitoplasmas, estos deben ser registrados con el rango taxonómico de *Candidatus* (Murray ySchleifer, 1994; Murray yStackebrandt, 1995). Para el caso particular de los fitoplasmas, se pueden considerar a nuevo “*Candidatus* Phytoplasma sp.” si la secuencia del gen 16S rDNA presenta un valor de similitud menor del 97,5% respecto de la secuencia de fitoplasmas hasta el momento descritos (IRPMC, 2004). Para el caso

del fitoplasma ChTYXIII los valores de similitud hallados fueron menores al 97.5% en todos los casos. Para el caso de los genes *rpLV-rpsC* y *secA*, los valores de similitud nucleotídica siempre fueron menores al 97.5%, aún con fitoplasmas del grupo 16SrXIII. Los estudios filogenéticos confirmaron el origen monofilético de los aislamientos del fitoplasma ChTYXIII, relacionándolo más cercanamente con el fitoplasma MPV. Todos estos resultados entonces permiten designar a los aislamientos relacionados al fitoplasma ChTYXIII como miembros de una nueva especie que se está proponiendo con el nombre de “*Candidatus Phytoplasma meliae*”. Se designa a su vez el aislamiento ChTYXIII-Mo3 (Montecarlo, Misiones) como la cepa de referencia y el resto de los aislamientos como secuencias/aislamientos relacionadas.

No solo se ha reconocido al fitoplasma ChTYXIII como un nuevo ‘*Ca. Phytoplasma sp.*’, sino que también se ha ajustado un sistema de detección preciso del mismo mediante PCR. A partir de la secuencia parcial del gen *secA* se generó un juego de *primers* específicos del fitoplasma ChTYXIII, lo cual fue comprobado empleándolo en reacciones de PCR con ADN de otros fitoplasma de diversos grupos 16Sr.

Por otro lado se logró caracterizar molecularmente regiones genómicas relacionadas con mecanismos de interacción patógeno-hospedante en el fitoplasma ChTYXIII. Se comprobó la presencia de la proteína *amp* (antigenic membrane protein) en todos los aislamientos del fitoplasmas ChTYXIII estudiados, la cual se encuentra flanqueada por los genes *groEL* (extremo 5’) y *nadE* (extremo 3’) tal cual lo describen trabajos previos (Kakizawa et al., 2004, 2006a). La proteína *amp* caracterizada consta de 158aa, con un peso molecular estimado de 17.07kDa, dos regiones transmembrana ubicadas en los extremos N-terminal (péptido señal) y extremo C-terminal. A su vez se identificó la presencia de un sitio del clivaje entre los residuos 36-37 y una región hidrofílica central de 94aa. Todas estas características coinciden con las de la proteína *amp* previamente descrita en otros fitoplasmas (Kakizawa et al., 2004, 2006; Yu et al., 1998; Bárbara et al., 2002; Fabre et al., 2011; Lu y Xia, 2012; Arashida et al., 2008). En lo que se refiere a la similitud, estos resultados demuestran que la proteína *amp* del fitoplasma ChTYXIII difiere respecto de otras secuencias descritas en fitoplasmas filogenéticamente cercanos. Se ha reportado previamente que la secuencia de la proteína *amp* es altamente divergente (Barbara et al., 2002), sobre todo en la porción hidrofílica

central sobre la cual ha sido observada una alta presión de selección (Kakizawa et al., 2006a, b). Para el caso de la proteína amp-ChTYXIII se ha observado valores de identidad mayores en los dominios N-terminal/*amp*-E(péptido señal) y C-terminal/*amp*-T que los encontrados para el dominio *amp*-H, lo que resulta consistente con lo publicado hasta el momento (Barbara et al., 2002; Kakizawa et al., 2006a; Arashida et al., 2008). Los estudios de presión de selección, han revelado que la región *amp*-H, es la que esta sometida a una mayor presión de selección positiva, puesto que presenta la mayor cantidad de codones con valores de dN-dS (sustituciones no sinónimas – sustituciones sinónimas) mayores a 0. Estos resultados se condicen con los obtenidos, en proteínas ortólogas presentes en otros fitoplasmas (Kakisawa et al., 2006b, Fabre et al., 2011). Dado el hecho de que las proteínas del tipo *amp* son altamente divergentes en sus dominios hidrofílicos, se supone que cumplen un rol fundamental en la interacción patógeno-hospedante (Kakizawa et al., 2006). En concordancia con esto último, se ha reportado que la proteína *amp* del fitoplasma OY-M forma un complejo con las proteínas actina y miosina (componentes de los microfilamentos) de los insectos vectores de dicho fitoplasma, y que la formación de dicho complejo esta correlacionada con la especificidad del vector (Susuki et al., 2006).

En lo que se refiere a la proteína imp, para el fitoplasma ChTYXIII no se ha podido conseguir la amplificación de fragmento genómicos mediante PCR que contengan la secuencia de la misma en ninguna de las estrategias empleadas. Sin embargo cuando se empleó como DNA molde el correspondiente al fitoplasma ACLL (16SrI-B, Torres et al., 2004), se logró amplificar e identificar la secuencia de la proteína imp en el fragmento amplificado, la cual presento una identidad aminoacídica de 100% con el fitoplasma *Onion yellows* (grupo 16SrI) (WP_011160959). La proteína imp es considerada, dentro de las IDPs, como la proteína ancestral (Kakizawa et al.2009), ya que ha sido detectada e fitoplasmas de los grupos 16SrI, 16SrII 16SrIII y 16SrXII entre otros (Bonrod et al., 2012, Andersen et al., 2013) y luego los niveles de expresión de las proteínas IdpA y amp han ido aumentando dependiendo del fitoplasma (Kakizawa et al., 2009). El hecho de no haberla detectado en el fitoplasma ChTYXIII no necesariamente implique que esta proteína no esté presente, sino que pudiera deberse a que los *primers* empleados, tanto los tomados de bibliografía como los diseñados en este tesis, tengan

bajo niveles de hibridación. También puede deberse a que la proteína *imp* en fitoplasma ChTYXIII, la organización de los genes flanqueantes sea distinta. La comprobación de esta y otras hipótesis relacionadas a la presencia/ausencia de la proteína *imp* en el fitoplasma ChTYXIII podrá ser solventada con el secuenciamiento del genoma completo de dicho patógeno y la búsqueda por homología dentro del mismo de proteínas ortólogas a la *imp*, tal como se ha descrito en otros fitoplasmas (Oshima et al., 2004, Bai et al., 2006, Tran-Nuguyen et al., 2008, Andersen et al., 2013, Kube et al., 2008, Chung et al., 2013, Mitrovic et al., 2014, Kakizawa et al., 2014, Chen et al., 2014, Saccardo et al., 2012)

Dado que no se conoce nada acerca de los posibles vectores del fitoplasma ChTYXIII la identificación y caracterización del gen *amp* en dicho patógeno permitirá entre otras cosas realizar estudios en los que se permita detectar de manera más eficiente posibles vectores de la enfermedad a través de estudios de interacción entre la proteína *amp* y las proteínas de los insectos. Por otro lado, los estudios llevados a cabo en la secuencia aminoacídica han demostrado que la proteína *amp*-ChTYXIII es notablemente distinta de las que se han descrito hasta el momento, aún para aquellos fitoplasmas relacionados desde el punto de vista filogenético, es por ello que se debería corroborar si los mecanismos de interacción con los microfilamentos de los insectos vectores se produce de la misma manera a lo descrito para los fitoplasmas del grupo 16SrI (Suzuki et al., 2006, Galetto et al., 2011). De comprobarse que el mecanismo es el mismo en el fitoplasma ChTYXIII, podría emplearse dicha información en la generación de sistemas de detección de posibles vectores mediante análisis de Western Blots entre las proteínas de insectos candidatos de ser transmisores y la proteína *amp* generada *in vitro* (Suzuki et al., 2006, Galetto et al., 2011, Rashidi et al., 2015). La detección e identificación de insectos vectores del fitoplasma ChTYXIII permitirá entender con mayor precisión su distribución, ya que al conocer el/los insectos vectores del mismo y su distribución podemos cotejarla con la distribución del patógeno y determinar si existen patrones en común o alguna relación entre ambos. Por otra parte dicha proteína sería un candidato ideal para la generación de sueros ya que se producen en gran cantidad por parte de los patógenos y su constitución aminoacídica tan diferente

a todas las reportadas es de esperar que los sueros lleguen a ser altamente específicos ya sea para la detección masiva.

Conclusiones Finales

Patosistema enrojecimiento letal de la frutilla-fitoplasmas

- Desde el punto de vista epidemiológico se logró en primera instancia poner a punto un sistema de diagnóstico específico de fitoplasmas en frutilla mediante PCR disminuyendo notablemente la presencia de compuestos inhibidores de la polimerasa. Luego fue posible determinar la diversidad de fitoplasmas asociados a la enfermedad de *enrojecimiento letal* (EL) en distintas regiones productoras de frutilla (*Fragaria x ananassa*) de Argentina. Se demostró que existen al menos 4 grupos 16Sr asociados a dicha enfermedad (16SrXIII, 16SrIII, 16SrVII y 16SrI).
- Para determinar la importancia de la enfermedad se realizaron muestreos en lotes productores de la región de Lules (Tucumán) durante el periodo 2010-2012 evaluando la incidencia y prevalencia de la enfermedad de EL y su relación con los distintos cultivares y viveros de origen. Los resultados de dicho análisis permitieron establecer una relación (estadísticamente significativa) entre los distintos cultivares y la proporción de plantas EL (incidencia), así como también entre los distintos viveros y la proporción de plantas EL. Por otro lado no se pudieron establecer relaciones entre la prevalencia y las variables anteriormente mencionadas.
- Por otro lado se determinó que existe una relación entre la presencia del síntoma EL y la presencia de fitoplasmas, aunque esta relación solo puede explicar un 12.08 % de los casos.
- Desde el punto de vista molecular se han caracterizado 10 aislamientos de fitoplasmas asociados a la enfermedad EL mediante el análisis de la secuencia parcial del gen 16Sr DNA. El análisis de los patrones RFLP *in silico*, similitud

nucleotídica y filogenia han permitido describir la taxonomía de los fitoplasmas analizados con mayor claridad. Se han caracterizado fitoplasmas del grupo 16SrIII filogenéticamente relacionados con los subgrupos 16SrIII-J y 16SrIII-X previamente descritos en la región. También se ha determinado la presencia de un fitoplasma del grupo-subgrupo 16SrVII-C, cercanamente relacionado con fitoplasmas previamente descritos y únicos para la zona.

- Respecto a los fitoplasmas del grupo 16SrXIII, se caracterizó al fitoplasma *Strawberry red leaf* StrawRL, el cual fue clasificado como un nuevo subgrupo 16SrXIII-F propio de la región y sin antecedentes de haber sido descrito en otra parte del mundo. Por último la presencia de aislamientos del subgrupo 16SrXIII-A (solo citado en América del Norte) o cercanamente relacionados al mismo, presupone un ingreso de los mismos a través de plantas madres infectadas importadas.

Patosistema amarillamiento del paraíso-fitoplasmas

- Desde el punto de vista de la caracterización epidemiológica se logró determinar con mayor precisión la distribución geográfica en Argentina de los fitoplasmas *China tree yellows* ChTYXIII (16SrXIII-C) y *China tree decline* ChTDIII (16SrIII-D) asociados a la enfermedad de declinamiento-amarillamiento del paraíso (*Melia azedarach*).
- Respecto al fitoplasma ChTYXIII, objeto de estudio de nuestra tesis, se determinó que su distribución está restringida a la región del noroeste Argentino (provincias de Misiones, Chaco, Formosa, y Norte de Corrientes) con el registro más austral del mismo cercano a la localidad de Yapeyú (Corrientes, 29°28'05.1"S). Su distribución

se corresponde con la determinada en investigaciones previas (Arneodo et al., 2007) y se presume que la misma estaría sujeta a la distribución de sus insectos vectores.

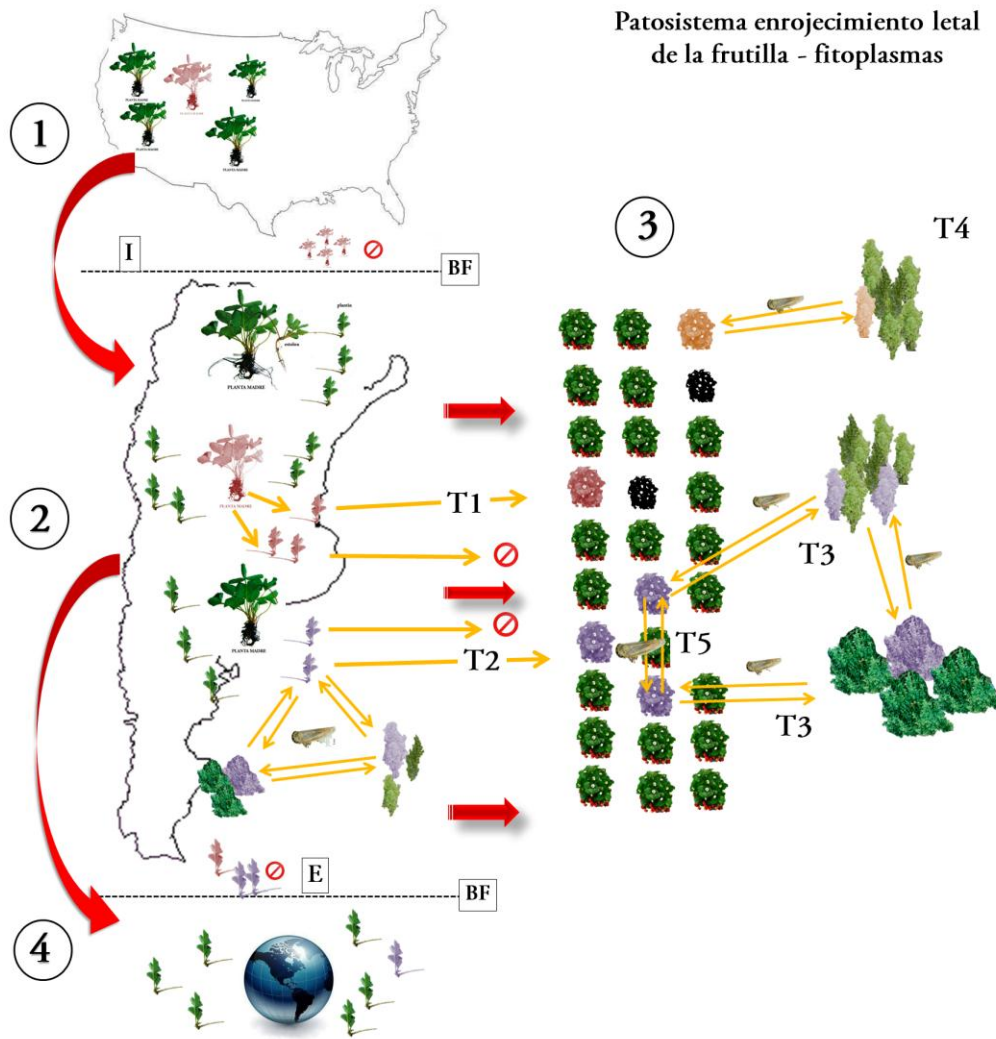
- Desde el punto de vista molecular, se lograron caracterizar regiones genómicas conservadas (genes 16Sr DNA, rpLV-rpsC y secA) y regiones genómicas relacionadas con mecanismos de patogenicidad (proteína inmunodominante de membrana tipo amp). Los análisis tanto de RFLP *in silico*, similitud nucleotídica y filogenia de regiones genómicas conservadas determinaron que el fitoplasma ChTYXIII constituye una nueva especie de fitoplasma denominada ‘*Candidatus Phytoplasma meliae*’ (*meliae*, de *Melia azedarach* su hospedante natural).
- Respecto a la proteína tipo amp, se logró obtener la secuencia completa de la misma y la secuencia parcial de los genes flanqueantes en todos los aislamientos del ‘*Ca. Phytoplasma meliae*’ analizados. La proteína amp descrita está organizada en una región central hidrofílica (H), dos regiones transmembrana en los extremos carboxi-terminal y amino-terminal, estando este último clivado, por lo que la proteína solo está anclada a la membrana plasmática en una sola región transmembrana. Esta organización se corresponde con las descripciones previamente hechas de sus ortólogas en otras especies de fitoplasmas. A su vez se comprobó que la región H es la que mayor variabilidad presenta y que la misma está sujeta a una presión de selección positiva, por lo que posiblemente juegue roles importantes en lo que ha interacción fitoplasma-hospedante se refiere.
- Por otro lado, se logró generar un antisuero policlonal específico en contra de la proteína secA del fitoplasma ‘*Ca. phytoplasma meliae*’. El mismo permitió, mediante inmunohistoquímica, reconocer de manera específica al fitoplasma en estudio en tejidos infectado de paraísos (hospedante natural) y vincas (hospedante

alternativo). A su vez, y en base a la secuencia nucleotídica del mismo gen, fue posible generar un juego de *primers* que detectan específicamente al ‘*Ca. Phytoplasma meliae*’ en reacciones de PCR.

Esquemas Conceptuales

Patosistema enrojecimiento letal de la frutilla

Esquema conceptual 1: Se plantean, de manera hipotética, los distintos factores que pueden intervenir en este patosistema **1:** Producción de plantas madres (California, USA) que son importadas a la Argentina (**I**); **BF:** Barrera Fitosanitaria (organismos encargados de certificar la sanidad de los ejemplares ingresados) en la que se observan plantines infectados con fitoplasmas que han sido retenidos. **2:** Reproducción agámica para multiplicación de plantas a partir de estolones de las plantas de frutilla importadas en viveros argentinos, que al año siguiente serán implantados a campo; **T1:** mecanismo de transmisión tipo 1 en el que una planta infectada con fitoplasmas nativos del lugar de origen del material vegetal ingresa sin ser detectada por la BF. La misma es reproducida en viveros locales y algunos de esos plantines son implantados a campo donde desarrollan la enfermedad mientras que otros son eliminados en procesos de selección; **T2:** Mecanismo de transmisión tipo 2 en el que los plantines reproducidos en invernaderos antes de ser implantados a campo son infectados por fitoplasmas locales por insectos vectores que lo toman desde malezas o cultivos en los que el/los fitoplasmas ya están presentes. **3:** Cultivo de frutilla en el que se observan plantas con enrojecimiento letal infectadas con distintos fitoplasmas representadas por distintos colores, **T3:** mecanismo de transmisión tipo 3 en el que fitoplasmas nativos de esta región (grupos 16SrVII y 16SrIII) son transmitidos a los ejemplares de frutilla implantados a campo mediante insectos vectores que lo toman desde malezas que actúan como reservorios de los mismos o bien lo transmiten a otros cultivos, **T4:** Mecanismo de transmisión tipo 4 en el que el fitoplasma StrawRL (grupo 16SrXIII-F, nativo de la región) es transmitido desde las malezas circundantes que actúan como reservorio hacia el cultivo mediante insectos vectores y **T5:** mecanismo de transmisión tipo 5 en el que la dispersión de fitoplasmas en el cultivo puede estar siendo generada por fitoplasmas que transmiten planta-planta dentro del mismo cultivo (se generaliza el mecanismo con un solo fitoplasma pero se extiende al resto de los presentes en el sistema). **4:** Exportación de plantines de frutilla (E) desde la Argentina a otros países productores, en el que también intervienen barreras fitosanitarias (BF)

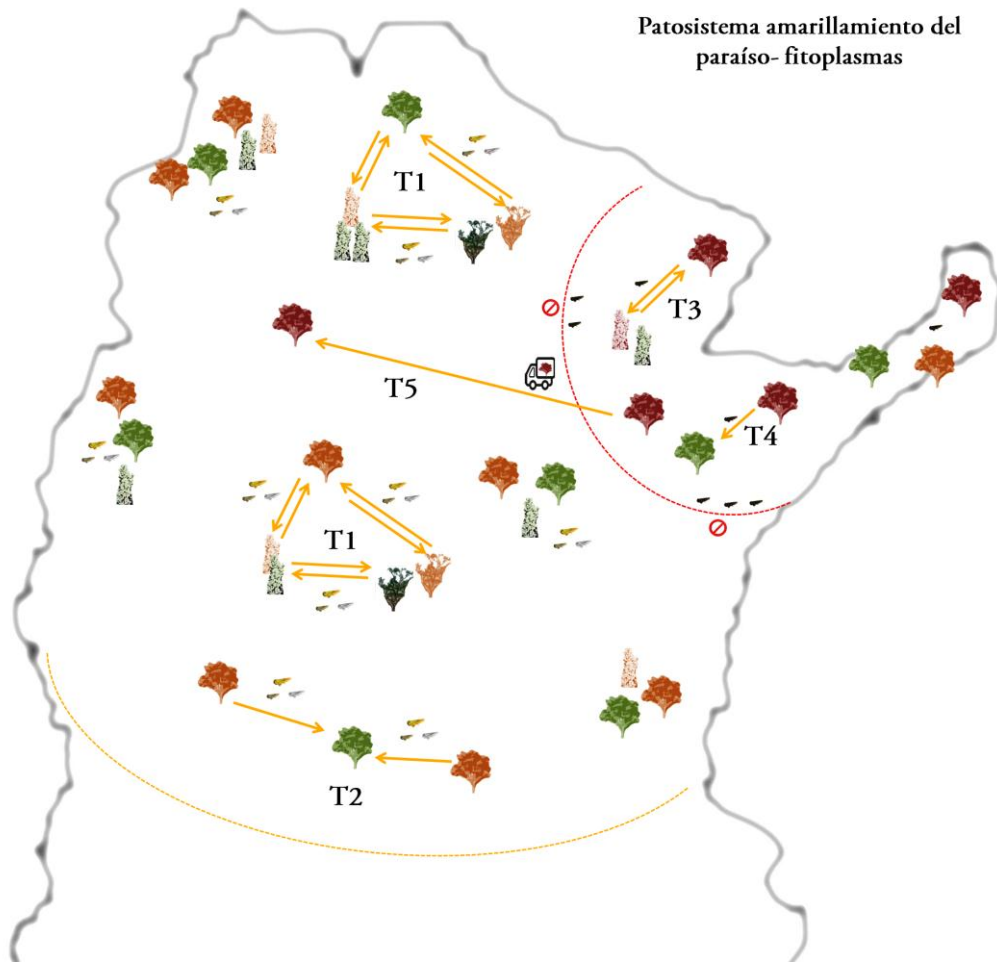














- Planta Madre de frutilla sana
 - Planta Madre de frutilla infectada con fitoplasma del subgrupo 16SrXIII-A
 - Plantines derivados de planta Madre sana
 - Plantines derivados de planta Madre infectada con fitoplasma 16SrXIII-A
 - Plantines infectados con fitoplasmas nativos de los grupos 16SrVII o 16SrIII u otro
 - Plantas de frutilla a campo sanas
 - Plantas de frutilla a campo infectada con fitoplasmas del subgrupo 16SrXIII-A
 - Plantas de frutilla a campo infectada con fitoplasmas nativos de los grupos 16SrVII o 16SrIII
 - Plantas de frutilla a campo infectada con el fitoplasma StrawRL del subgrupo 16SrXIII-F
 - Plantas de frutilla muerta debido a infección por alguno de los fitoplasmas
 - Planta de maleza sana
 - Planta de maleza infectada con fitoplasmas nativos de los grupos 16SrVII o 16SrIII
 - Planta de maleza infectada con el fitoplasma StrawRL del subgrupo 16SrXIII-F
 - Cultivo sano
 - Cultivo infectado con fitoplasmas nativos de los grupos 16SrVII o 16SrIII
 - Insecto/s vector/es
 - Prohibición de ingreso al sistema
 - BF Barrera fitosanitaria I Importación E Exportación
- 1 USA 2 Argentina 3 Lote de producción 4 Exterior

Esquema conceptual 2: El siguiente esquema conceptual, sintetiza las principales variables y las relaciones entre estas, que estarían influyendo en el patosistema enrojecimiento letal de la frutilla. En lugar central se ubica la variable cultivo/ enfermas que representa las plantas de frutilla enfermas (*EL*) con fitoplasmas. Esta variable, se ve influenciada por la incorporación de plantas enfermas importadas en los viveros de Argentina a una tasa que esta siendo influenciada por variables ambientales (*VA*), los controles fitosanitarios (*CF*) y el cultivar importado (*cv*). En este caso, favorecidos por condiciones ambientales propicias, controles fitosanitarios poco exhaustivos y cultivares de frutilla mas susceptibles, la tasa de incorporación de plantas de frutilla infectadas con fitoplasmas será mayor. A su vez, dado que la Argentina exporta plantines a otros países, la variable exportación del plantines infectados puede estar siendo influenciada por variables tales como las practicas agrícolas o los controles fitosanitarios. Respecto a esto ultimo, si los controles fitosanitarios son poco exhaustivos y si las practicas agrícolas favorecen la permanencia de plantines infectados, entonces la probabilidad de exportar plantines infectados con fitoplasmas exportados será mayor. Este mecanismo se relaciona con los resultados encontrados en la presente tesis, ya que fue posible registrar la presencia de fitoplasmas propios de la zona en donde se producen las plantas madres que Argentina compra para su multiplicación. Por otro lado, la variable Cultivo/Enfermas, esta siendo influenciada también por la infección a campo mediada por insectos vectores. En este proceso, un insecto vector sano se convierte e infectivo a una tasa que depende de las condiciones ambientales (*VA*) y de la identidad del fitoplasmas (*IF*) y de la disponibilidad de fitoplasmas (*DF*). Una vez que se convierten en infectivos, estos insectos pueden infectar plantas de frutilla a campo a una tasa que depende de las *VA*, el cultivar implantado (nuestros resultados sugieren que existen cultivares de frutilla mas susceptibles) y de los controles fitosanitarios. Este mecanismo de adquisición se ve sustentado por nuestros resultados, ya que se ha demostrado la infección de plantas de frutilla a campo con fitoplasmas previamente descritos en la región. Por ultimo, la tasa de muerte de las plantas *EL* estaría dependiendo de las variables ambientales, la identidad del fitoplasma, el cultivar y el estado fenológico de la planta.

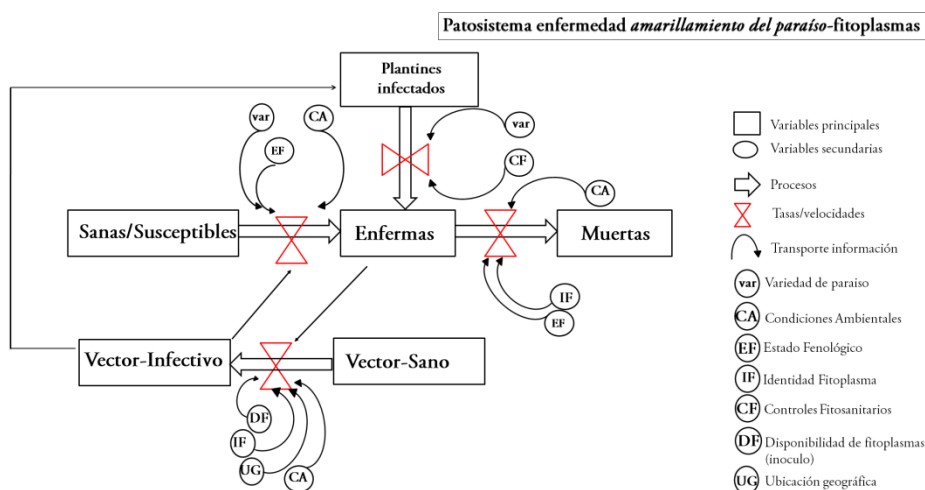
Patosistema amarillamiento del paraíso

Esquema conceptual 1: Se plantea, de manera hipotética, distintos factores que intervienen en la estructura del patosistema amarillamiento del paraíso. El fitoplasma China tree decline (ChTDIII), representado por el color anaranjado, se encuentra distribuido en toda la Argentina (límite Sur aproximado demarcado por la línea de puntos anaranjada). **T1:** mecanismo de transmisión en el que el fitoplasma ChTDIII es transmitido desde una maleza nativa infectada o desde un cultivo circundante infectado hacia plantas de paraíso y todas las combinaciones posibles entre estos tres hospedantes mediada por la acción de un complejo de insectos vectores el cual puede estar comprendido por 1 insecto ampliamente distribuido en nuestro territorio y polífago, varios insectos polífagos u olifagos o bien insectos monófagos que transmiten el fitoplasmas dentro de cada hospedante e insectos polífagos u olifagos que lo transmiten entre hospedantes. **T2:** mecanismo de transmisión en el que a partir de un paraíso infectado (previamente infectado por mecanismos T1) se trasmite a un paraíso sano mediante la acción de un insecto monofago/olifago. El fitoplasma China tree yellows (ChTYXIII) tiene una distribución restringida al nordeste de nuestro país (y algunos reportes de países limítrofes) la cual está delimitada por la línea punteada roja. **T3:** mecanismo de transmisión en el que el fitoplasma ChTYXIII se transmite desde una maleza (reservorio natural) hacia un paraíso mediante la acción de un vector olifago. Este mecanismo se sustenta en el hecho de que el análisis filogenético del fitoplasma ChTYXIII, determinó que se trata de una especie única y que solo ha sido registrada en esta región (América del Sur) y por lo tanto ha de tener como reservorio natural alguna especie nativa, ya que el paraíso ha sido introducido recientemente, **T4:** transmisión paraíso-paraíso mediante un vector monófago. **T5:** mecanismo de transmisión en el que la presencia del fitoplasma ChTYXIII en regiones que se encuentre por fuera de su distribución natural esté sujeta al transporte de material infectado en origen hacia otras localidades sin que sean detectados por los organismos de control sanitario pertinentes.



-  Planta de paraíso sano
-  Planta de paraíso infectado con el fitoplasma China tree decline (16SrIII-B)
-  Planta de paraíso infectado con el fitoplasma China tree yellows (16SrXIII-C)
-  Planta de maleza nativa sana
-  Planta de maleza infectada con el fitoplasma China tree decline (16SrIII-B)
-  Planta de maleza infectada con el fitoplasma China tree yellows (16SrXIII-C)
-  Cultivo sano
-  Cultivo infectado con fitoplasmas del subgrupo 16SrIII-B
-  Complejo de insectos vectores (1 o varios insectos polífagos/varios insectos monófagos/insectos polífagos y monófagos)
Involucrados en la transmisión del fitoplasma China tree decline
-  Insecto vector del fitoplasma China tree yellows (16SrXIII-C)
-  Transporte de material vegetal, eventualmente infectado
-  Límite aproximado de la región ecológicamente apta para la vida del insecto vector del fitoplasma 16SrXIII-C

Esquema conceptual 2: El siguiente esquema conceptual, sintetiza las principales variables y las relaciones entre estas, que estarían influyendo en el patosistema amarillamiento del paraíso. En lugar central se ubica la variable cultivo/ enfermas que representa las plantas de paraíso enfermas con fitoplasmas. En este patosistema intervienen dos fitoplasmas, el *China tree decline* ChTDIII (16SrIII-B) de amplia distribución en nuestro país, y el fitoplasma *China tree yellows* ChTYXIII (16SrXIII-C), con una distribución restringida al noroeste de nuestro país. Por un lado, las plantas sanas y susceptibles de paraíso, esta siendo infectadas con fitoplasmas (Enfermas) a una tasa que depende de las condiciones ambientales (CA), la variedad del paraíso afectado (var) y el estado fenológico de la planta (EF). Esta tasa de infección se vera afectada también por la presencia de vectores infectivos. Una de las posibles explicaciones de las diferencias en la distribución de los dos fitoplasmas, radica en el hecho de que estos patógenos están siendo dispersados por vectores distintos o grupos de vectores distintos. Es por ello que la presencia de vectores infectivos (en tanto a su numero como a su especie) es una variable que influye marcadamente en el proceso de infección. Por otro lado, la presencia de plantas enfermas estaría también siendo influenciada por la presencia de plantines infectados, con una tasa que dependería tanto de la variedad del paraíso como de los controles fitosanitarios. Por ultimo la cantidad de plantas enfermas que mueren estarían sometidas a una tasa que depende de las condiciones ambientales, como de la identidad del fitoplasma y el estado fenológico de la misma.



Se puede observar que entre ambos patosistemas existen algunos mecanismos comunes. En primer lugar la presencia de vectores infectivos es una variable de peso, ya que es el mecanismo por el que comúnmente se infectan ambas especies. Las relaciones filogenéticas de los fitoplasmas estudiados en esta tesis, han demostrado que estos se relacionan mas estrechamente con fitoplasmas presentes en nuestra región. Es por ello que se supone la existencia de vectores locales que transmiten la enfermedad desde reservorios naturales (malezas por ej.) hacia los cultivos estudiados. Sin embargo la acción del hombre también puede generar la dispersión de fitoplasmas. En el caso del enrojecimiento letal, la presencia de fitoplasmas del subgrupon 16SrXIII-A, el cual solo ha sido reportado en la región donde se producen las plantas andres que importa Argentina para su multiplicación, estaría indicando un ingreso a nuestro país producto de la comercialización de material entre ambos países. Asu vez, el fitoplasma ChTYXIII, ha sido reportado en regiones por fuera del noroeste Argentino, lo cual podría estar explicado por el transporte de material infectado hacia otras zonas.

Bibliografía

- Al-Saad NA, Khan AJ, Calari A, Al-Subhi AM and Bertaccini A. (2008). ‘*Candidatus Phytoplasma omanense*’, associated with witches’-broom of *Cassia italica* (Mill.) Spreng.in Oman. *Int J Syst Evol Microbiol*, 58:461–466.
- Ammar E-D and Hogenhout SA. (2006). Mollicutes associated with arthropods and plants. In: Kostas B, Miller T (eds) *Insect symbiosis*, vol II. CRC Press, Boca Raton, pp 97–118.
- Andersen MT, Liefting LW, Havukkala I and Beever R. (2013). Comparison of the complete genome sequence of two closely related isolates of ‘*Candidatus Phytoplasma australiense*’ reveals genome plasticity. *BMC genomics*, 14:529.
- Andrews TD and Gojobori T. (2004). Strong positive selection and recombination drive the antigenic variation of the Pile protein of the human pathogen *Neisseria meningitidis*. *Genetics*, 166:25-32.
- Arashida R, Kakizawa S, Ishii Y, Hoshi A, Jung HY., Kagi-wada S, Yamaji Y, Oshima K and Namba S. (2008). Cloning and characterization of the antigenic membrane protein (Amp) gene and in situ detection of Amp from malformed flowers infected with Japanese hydrangea phyllody phytoplasma. *Phytopathology*, 98:769–775.
- Arashida R, Kakizawa S, Hoshi A, Ishii Y, Jung HY, Kagiwada S, Yamaji Y, Oshima K, and Namba S. (2008). *DNA and Cell Biology*, 27: 209-217.
- Arnaud G, Malembic-Maher S, Salar P, Bonnet P, Maixner M, Marcone C, Boudon-Padiou E and Foissac X. (2007). Multilocus sequence typing confirms the close genetic interrelatedness of three distinct flavescence dorée phytoplasma strain clusters and group 16SrV phytoplasmas infecting grapevine and alder in Europe. *Appl Environ Microb*, 73(12):4001-4010.
- Arneodo JD, Galdeano E, Orrego A, Stauffer A, Nome SF and Conci LR. (2005). Identification of two phytoplasmas detected in China trees with decline symptoms in Paraguay. *Australas Plant Pathol*, 34:583–585.
- Arneodo JD, Marini DC, Galdeano E, Meneguzzi N, Domecq C and Nome SF.(2007). Diversity and Geographical Distribution of Phytoplasmas infecting China-tree in Argentina. *J Phytopathol*, 75: 70–75.
- Arocha Y, Antesana O, Montellano E, Franco P, Plata G and Jones P. (2007). ‘*Candidatus Phytoplasma lycopersici*’, a phytoplasma associated with ‘hoja de perejil’ disease in Bolivia. *Int J Syst Evol Microbiol*, 57:1704–1710.
- Arocha Y, López M, Piñol B, Fernández M, Picornell B, Almeida R, Palenzuela I, Wilson MR and Jones P. (2005). ‘*Candidatus Phytoplasma graminis*’ and

- ‘*Candidatus Phytoplasma caricae*’, two novel phytoplasmas associated with diseases of sugarcane, weeds and papaya in Cuba. *Int J Syst Evol Microbiol*, 55:2451–2463.
- Bai X, Zhang J, Ewing A, Miller SA, Radek A, Schevchenko DV, Tsukerman K, Walunas T, Lapidus A, Campbell JW and Hogenhout SA. (2006). Living with genome instability: the adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts. *J Bacteriol*, 188:3682–3696.
- Barbara DJ, Morton A, Clark MF and Davies DL. (2002). Immunodominant membrane proteins from two phytoplasmas in the aster yellows clade (chlorate aster yellows and clover phyllody) are highly divergent in the major hydrophilic region. *Microbiology*, 148:157–167.
- Baric S and Dalla-Via J. (2004). A new approach to apple proliferation detection: a highly sensitive real-time PCR assay. *J Microbial Biotech*, 57:135-145.
- Barra M, Salazar E, Beltrán M and Sagredo B. (2012). Simple and robust DNA extraction method for the large-scale analysis of genotypes containing high polyphenolic content, such as landraces of *Solanum tuberosum* and *Zea mays*. *Cien. Inv. Agr.*, 39(3):593-601.
- Barros TSL, Davis RE, Resende RO and Dally EL. (2002). Erigeron Witches’-Broom Phytoplasma in Brazil Represents New Subgroup VII-B in 16S rRNA Gene Group VII, the Ash Yellows Phytoplasma Group. *Plant Dis*, 86:1142–1148.
- Becker E, Agostini J and Costas R. (2008). Efectos de la densidad de plantación sobre el crecimiento e incidencia del amarillamiento en *Melia azedarach* L. con aplicación de antibióticos. XIII Jornadas Técnicas Forestales y Ambientales. Facultad de Ciencias Forestales, UNaM – EEA Montecarlo, INTA.
- Berg M, Davies DL, Clark MF, Vetten HJ, Maier G, Marccone C and Seemuller E. (1999). Isolation of the gene encoding an immunodominant membrane protein of the apple proliferation phytoplasma, and expression and characterization of the gene product. *Microbiology*, 145:1937–1943.
- Bertaccini A. (2007). Phytoplasmas: diversity, taxonomy, and epidemiology. *Front. Biosc.*, 12:673-679.
- Bertaccini A and Duduk B. (2009). Phytoplasma and phytoplasma diseases: a review of recent research. *Phytopathol Mediterr*, 48:355–378.
- Birschwilks M, Haupt S, Hofius D and Neumann S. (2006). Transfer of phloemmobile substances from the host plants to the holoparasite *Cuscuta* sp. *J Exp Bot*, 57: 911–921.
- Blomquist CL, Barbara DJ, Davies DL, Clark MF and Kirkpatrick BC. (2001). An immunodominant membrane protein gene from the Western X-disease phytoplasma is distinct from those of other phytoplasmas. *Microbiology*, 147:571–580.

- Boonrod K, Munteanu B, Jarausch B, Jarausch W and Krczal G. (2012). An immunodominant membrane protein (Imp) of '*Candidatus Phytoplasma mali*' binds to plant actin. *Mol Plant Microbe Int*, 25:889–895.
- Boudon-Padieu E, Larrue J and Caudwell A. (1989). ELISA and dot- blot detection of Flarescence dorée-MLO in individual leafhopper vectors during latency and inoculative state. *Curr.Microbiol.*, 19:357-364.
- Braun EJ and Sinclair WA. (1978). Translocation in phloem necrosis-diseased American elm seedlings. *Phytopathology*, 68:1733-1737.
- Calari A, Paltrinieri S, Contaldo N, Sakalieva D, Mori N, Duduk B and Bertaccini A. (2011). Molecular evidence of phytoplasmas in winter oilseed rape, tomato and corn seedlings. *Bull Insectology*, 64.
- Catalano MI. (2011). Cicadélidos vectores de fitoplasmas a cultivos de importancia económica en la Argentina Sistemática y bioecología (Insecta- Auchenorrhyncha- Cicadellidae). Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, UNLP. 142pp.
- Chen TA and Jiang YP. (1990). Progress in the detection of plant mycoplasma-like organisms by using monoclonal and polyclonal antibodies. *Zentralbl.Bakteriol.Suppl.*, 20:270-275.
- Chen W, Li Y, Wang Q, Wang N and Wu Y. (2014). Comparative Genome Analysis of Wheat Blue Dwarf Phytoplasma, an Obligate Pathogen That Causes Wheat Blue Dwarf Disease in China. *PLoS ONE*, 9(5): e96436. doi:10.1371/journal.pone.0096436.
- Chiykowski LN and Craig DL. (1975). Reaction of strawberry cultivars to clover phyllody (green petal) agent transmitted by *Aphrodes bicincta*. *Can. Plant. Dis. Surv.*, 55:66-68.
- Christensen NM, Axelsen KB, Nicolaisen M and Schulz A. (2005). Phytoplasmas and their interactions with hosts. *Trends Plant Sci*, 10(11):526-535.
- Christensen NM, Nicolaisen M, Hansen Mand Schulz A. (2004). Distribution of phytoplasmas in infected plants as revealed by real-time PCR and bioimaging. *Mol Plant Microbe In*, 17(11):1175-1184.
- Chung WC, Chen LL, Lo WS, Lin CO and Kuo CH. (2013). Comparative Analysis of the Peanut Witches'-Broom Phytoplasma Genome Reveals Horizontal Transfer of Potential Mobile Units and Effectors. *Plos one*, e62770, doi:10.1371/journal.pone.0062770.
- Conci LR, Saavedra Pons A, Guzmán FA, Fernández FD, Galdeano E, Pérez Grosso T, Torres L, and Meneguzzi N. (2014). Advances in knowledge about phytoplasma diseases in Argentina. Food and Agriculture COST Action FA0807 Integrated

- Management of Phytoplasma Epidemics in Different Crop Systems, Chapter 2, pp. 82-89.
- Conci L, Meneguzzi N, Galdeano E, Torres L, Nome C and Nome S. (2005). Detection and molecular characterisation of an alfalfa phytoplasma in Argentina that represents a new subgroup in the 16S rDNA Ash Yellows group (“*Candidatus* Phytoplasma fraxini”). *Eur J Plant Pathol*, 113:255–265.
 - Conci VC, Gómez GG, Docampo DM and Conci LR. (1998). Phytoplasma associated with symptoms of *Tristeza* del ajo (Garlic decline) in garlic (*Allium sativum* L.). *J. Phytopathology*, 146:473–477.
 - Contaldo N, Paltrinieri S, Makarova O, Bertaccini A, Nicolaisen M. (2015). Q-bank phytoplasma: a DNA barcoding tool for phytoplasma identification. *Methods Mol Biol.* ;1302:123-35.
 - Constable FE, Gibb KS and Symons RH. (2003). Seasonal distribution of phytoplasmas in Australian grapevines. *Plant Pathol*, 52:267-276.
 - Cordova I, Jones P, Harrison N, and Oropeza C. (2003). In situ PCR detection of phytoplasma DNA in embryos from coconut palms with lethal yellowing disease. *Mol Plant Pathol*, 2:99-108.
 - Darriba D, Taboada GL, Doallo R and Posada D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9:772.
 - Davis RE, Lee I-M (1991) Mycoplasma-like organisms as plant disease agents—a review. *ATCC Q Newsl*, 11:7–11
 - Davis RE, Dally EL, Gundersen DE, Lee IM and Habili N. (1997). ‘*Candidatus* Phytoplasma australiense’, a new phytoplasma taxon associated with Australian grapevine yellows. *Int J Syst Bacteriol*, 47:262–269.
 - Davis RE, Zhao Y, Dally EL, Jomantiene R, Lee IM, Wei W and Kitajima EW. (2012). “*Candidatus* Phytoplasma sudamericanum”, a novel taxon, and strain PassWB-Br4, a new subgroup 16SrIII-V phytoplasma, from diseased passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.). *Int J Syst Evol Microbiol*, 62:984–989.
 - Deitsch KW, Moxon ER and Wellen TE. (1997). Shared themes of antigenic variations and virulence in bacterial, protozoal, and fungal infections. *Microbiol Mol Biol R*, 61:281-293.
- Deng S and Hiruki C. (1991). Amplification of 16S rRNA genes from culturable and non-culturable mollicutes. *J Microbiol Methods*, 14:53–61.
- Doi YM, Teranaka M, Yora K and Asuyama H. (1967). Mycoplasma or PTL-group-like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry

- dwarf, popato witches'-broom, aster yellows, or pawlonia wiches'-broom. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 33:259-266.
- Doyle J and Doyle JL. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12:13–15.
- Driessen AJ and Nouwen N. (2008). Protein translocation across the bacterial cytoplasmic membrane. *Annu Rev Biochem*, 77:643–667.
- Driessen AJ. (2001). SecB, a molecular chaperone with two faces. *Trends in Microbiology*, 9:193–6.
- Du Plessis DJF, Nouwen N and Driessen AJ. (2011). The Sec translocase. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1808:851–865.
- Duarte V, Silva EG, Hass ICR, Bedendo IP and Kitajima EW. (2009). First report of a group 16SrIII-B phytoplasma associated with decline of China tree in Brazil. *Plant Dis*, 93:666.
- Duduk B, Botti S, Ivanovic M, Krstic B, Dukic N and Bertaccini A. (2004). Identification of Phytoplasmas Associated with Grapevine Yellows in Serbia. *J. Phytopathol*, 152:575–579.
- Duong F and Wickner W. (1997). Distinct catalytic roles of the SecYE, SecG and SecDFyajC subunits of preprotein translocase holoenzyme. *EMBO Journal*, 16:2756–2768.
- Eckstein B, Barbosa JC, Kreyci PF, Zanol KMR, Coelho LBN, Gonçalves ML and Bedendo IP. (2014). Identification of potential leafhoppers vectors of phytoplasmas (16SrIII group) associated with broccoli stunt disease in Brazil. *Australas Plant Pathol*, 43: 459–463.
- Economu A. (1999). Following the leader: bacterial protein export through the Sec pathway. *Trends Microbiol*, 7:315–320.
- Edward DG and Freundt EA. (1967). Proposal for *Mollicutes* as name of the class established for the order *Mycoplasmatales*. *Int J Syst Bacteriol*, 17:267-268.
- EFSA PLH Panel (EFSA Panel on Plant Health). (2014). Scientific Opinion on pest categorisation of Grapevine Flavescence Dorée. *EFSA Journal* 2014, 12(10):3851, 31 pp. doi:10.2903/j.efsa.2014.3851.
- Errampalli D and Fletcher J. (1993). Production of monospecific poly-clonal antibodies against aster yellows mycoplasma-like organism-associated antigen. *Phytopathology*, 83:1279-1282.
- Fabre A, Danet JL and Foissac X. (2011). The stolbur phytoplasma antigenic membrane protein gene stamp is submitted to diversifying positive selection. *Gene*, 472:37-41.

- Fang X, Phillips D, Verheyen G, Li H, Sivasithamparam K, and Barbetti MJ. (2012). Yields and resistance of strawberry cultivars to crown and root diseases in the field, and cultivar responses to pathogens under controlled environment conditions. *Phytopathologia Mediterranea*, 51: 69-84.
- Felsenstein J. (1981). Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J. Molecular Evolution*, 17:368-376.
- Fernández FD, Meneguzzi N, Guzmán FA, Kirschbaum D, Vilma VC, Nome C and Conci LR. (2015). Detection and identification of a novel 16SrXIII subgroup phytoplasma associated with strawberry red leaf disease in Argentina. *Int J Syst Evol Microbiol* in press DOI 10.1099/ijms.0.000276.
- Fernández FD, Guzmán FA, Curzel V, Bejarano N and Conci, LR. (2013a). Detection and molecular characterization of a phytoplasma affecting *Prunus persica* L. in Jujuy, Argentina. *Eur J Plant Pathol*, 135:627–631.
- Fernández FD, Conci VC, Kirschbaum and Conci LR. (2013b). Molecular characterization of a phytoplasma of the ash yellows group occurring in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) plants in Argentina. *Eur J Plant Pathol*, 135:1–4.
- Fernández FD, Conci V, Meneguzzi N, Guzman F, Nome C, Kirschbaum D, Mollinedo V, Borquez A, Bains O, Ramallo JC, Agüero J y Conci LR. (2008a). Fitoplasma asociado al síntoma conocido como “planta maricona” en frutilla. 1º Congreso Argentino de Fitopatología. Mayo 2008, Córdoba-Argentina.
- Fernández FD, Conci V, Meneguzzi N, Conci L. (2008b). Detección de un nuevo fitoplasma del grupo 16Sr XIII infectando frutilla (*Fragaria x ananassa* Duch.) en Argentina. (Detection of a new 16Sr XIII group phytoplasma infecting strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) in Argentina). En Actas del VII Seminario Científico Internacional de Sanidad Vegetal, del 22 al 26 de Septiembre (2008), La Habana, Cuba.
- Filgueira JJ, Franco-Lara L, Salcedo JE, Gaitan SL and Boa ER. (2004). Urapan (*Fraxinus udhei*) dieback, a new disease associated with a phytoplasma in Colombia. *Plant Pathol*, 53:520.
- Fiore NF, Rodan S, Pltrinieri SP, Ajardo AG, Otti SB and Bertaccini AB. (2007). Molecular characterization of phytoplasmas in Chilean grapevines. *Bull Insectology* 60:331–332.
- Fitch WM. Distinguishing Homologous from Analogous Proteins. (1970). *Systematic Biology*, 19:99-113.
- Fletcher, J, Wayadande A, Melcher U and Ye F. (1998). The phytopathogenic mollicute-insect vector interface: a closer look. *Phytopathology*, 88:1351-1358.

- Florance ER and Cameron R. (1978). Three-dimensional structure and morphology of mycoplasma-like bodies associated with albino disease of *Prunus avium* L. *Phytopathology*, 68:75-80
- Flôres D and Bedendo IP. (2013). A subgroup 16SrIII-B phytoplasma identified in honeyweed plants with leaf deformation in Brazil. *Australasian Plant Disease Notes*, 8:59–62.
- Flôres D, Mello A, Junior NSM and Bedendo IP. (2013). First Report of a Group 16SrVII-C Phytoplasma Associated with Shoot Proliferation of Sunn Hemp (*Crotalaria juncea*) in Brazil. *Plant Dis*, 97:651.
- Frazier NW. (1974). Six new strawberry indicator clones evaluated for the detection and diagnosis of twelve graft-transmissible diseases. *Plant Disease Reporter*, 58:28-31.
- Freundt EA. (1955). The classification of the pleuropneumonia group of organisms (*Borrelomycetales*). *Int Bull Bacteriol Nomencl Taxon*, 5:67-78.
- Freundt, EA, Whitcomb RF, Barile MF, Razin S and Tully JG. (1984). Proposal for elevation of the family *Acholeplasmataceae* to ordinal rank: *Acholeplasmatales*. *Int J Syst Bacteriol*, 34:346-349.
- Gaillard de Benitez C, Pece M, Juárez de Galíndez M y Ríos N. (2002). Estimación del crecimiento y producción de una plantación de paraíso gigante (*Melia azedarach* var. gigantea) sin riego en la Provincia de Santiago del Estero, Argentina. *Quebracho*, 9:127– 140.
- Galdeano E, Guzmán FA, Fernández FD and Conci LR. (2013). Genetic diversity of 16SrIII group phytoplasmas in Argentina. Predominance of subgroups 16SrIII-J and B and two new subgroups 16SrIII-W and X. *Eur J Plant Pathol*, 137:753–764.
- Galdeano E, Conci LR, González O, Paradell S, Di Rienzo J, Nome C, and Conci VC. (2009). Epidemiological aspects of garlic decline disease caused by a phytoplasma in Asiatic and Argentinean garlic cultivars. *Australas Plant Pathol*, 38 (4):437-443.
- Galdeano E, Torres LE, Meneguzzi N, Guzman F, Gomez GG, Docampo DM and Conci LR. (2004). Molecular Characterization of 16S Ribosomal DNA and Phylogenetic Analysis of Two X-disease Group Phytoplasmas Affecting China-tree (*Melia azedarach* L.) and Garlic (*Allium sativum* L.) in Argentina. *J Phytopathol*, 152:174–181.
- Galletto L, Bosco D, Balestrini R, Genre A, Fletcher J and 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:e22571.
- Galletto L, Bosco D, Fletcher J, Turina M, Wayadande A and Marzachi C. (2008). Characterization of putative membrane protein genes of the ‘*Candidatus*

- Phytoplasma asteris', chrysanthemum yellows isolate. *Can. J. Microbiol.*, 54:341-351.
- Garnier M, Iskra GM, Zreik L, Gandar J, Fos A and Bove JM. (1990). Monoclonal antibodies against the MLO associated with tomato stolbur and clover phyllody. *Zentralbl.Bakteriol. Suppl*, 20:263-269.
- Golino DA, Oldfield GN and Gumpf DJ. (1989). Experimental hosts of the beet leafhopper-transmitted virescence agent. *Plant Dis*, 73:850-854.
- Gomez GG, Conci LR, Ducasse DA and Nome SF. (1996). Purification of the Phytoplasma Associated with China-tree (*Melia azedarach* L.) Decline and the Production of a Polyclonal Antiserum for its Detection. *J Phytopathol*, 144:473-477.
- González F, Zamorano A, Pino AM, Paltrinieri S, Bertaccini A and Fiore N. (2011). Identification of phytoplasma belonging to X-disease group in cherry in Chile. *Bull Insectology*, 64:235-236.
- Griffiths HM, Sinclair WA, Smart CD and Davis RE. (1999). The phytoplasma associated with ash yellows and lilac witches'-broom: 'Candidatus Phytoplasma fraxini'. *Int J Syst Bacteriol*, 49:1605-1614.
- Guindon S, Dufayard JF, Lefort V and Anisimova M. (2010). New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*, 59:307-321.
- Gundersen DE, Lee IM and Davis RE. (1994). RFLP analyses of ribosomal protein genes reveal strain diversity in MLO 16S rRNA groups I and III. *Phytopathology*, 84:1128.
- Guzmán FA, Giolitti F, Fernández FD, Nome C, Lenardon S and Conci LR. (2014). Identification and molecular characterization of a phytoplasma associated with sunflower in Argentina. *Eur J Plant Pathol*, 138:679-683.
- Haggis GH and Sinha RC. (1978). Scanning electron microscopy of mycoplasma-like organisms after freeze fracture of plant tissues affected with clover phyllody and aster yellows. *Phytopathology*, 68:677-680.
- Han SS, Baek SJ, Lee SH, Seo ST and Seralathan KK. (2014). First Report of Aster Yellows Phytoplasma (16SrI-B) Associated with Witches' Broom Disease of *Melia azedarach* var. *japonica* in Korea. *J Phytopathol*. DOI: 10.1111/jph.12356.
- Hanboonsong Y, Choosnic C, Panyim S and Danak S. (2002). Transovarial transmission of sugarcane white leaf phytoplasma in the insect vector *Matsumura teltix hiroglyphicus* (Matsumura). *Insect Mol Biol*, 11:97-103.
- Hansen AK, Trumble JT, Stouthamer R and Paine TD. (2008). A new huanglongbing species, "Candidatus liberibacter psyllaerous," found to infect tomato and potato, is

- vectored by the psyllid *Bactericera cockerelli* (Sulc). *Appl Environ Microb*, 74: 5862–5865.
- Harrison N, Davis RE, Oropeza C, Helmick E, Narvaez M, Eden-Green S, Dollet M and Dickinson M. (2014). ‘*Candidatus* Phytoplasma palmicola’, a novel taxon associated with a lethal yellowing-type disease (LYD) of coconut (*Cocos nucifera* L.) in Mozambique. *Int J Syst Evol Microbiol*, 64:1890-1899.
- Harrison NA and Carpio ML. (2006). First report of *Candidatus* Phytoplasma asteris related strains infecting chinaberry trees with leaf yellowing symptoms in Vietnam. *Plant Dis*, 90:527.
- Harrison NA, Boa E and Carpio ML. (2003). Characterization of phytoplasmas detected in Chinaberry trees with symptoms of leaf yellowing and decline in Bolivia. *Plant Pathol*, 52:147–157.
- Harrison NA, Legard DE, Di Bonito R and Richardson PA. (1997). Detection and differentiation of phytoplasmas associated with diseases of strawberry in Florida. *Plant Dis*, 81:230.
- Harrison NA, Richardson PA, Kramer JB and Tsai JH. (1994). Detection of the mycoplasma-like organism associated with lethal yellowing disease of palms in Florida by polymerase chain reaction. *Plant Pathol*, 43:998–1008.
- Hiruki C and Wang K. (2004). Clover proliferation phytoplasma: ‘*Candidatus* Phytoplasma trifolii’. *Int J Syst Evol Microbiol*, 54:1349–1353.
- Hodgetts J, Boonham N, Mumford R, Harrison N and Dickinson M. (2008). Phytoplasma phylogenetics based on analysis of *secA* and 23S rRNA gene sequences for improved resolution of candidate species of “*Candidatus* Phytoplasma”. *Int J Syst Evol Microbiol*, 58:1826–37.
- Hodgetts J, Crossley D, Dickinson M.(2013). Techniques for the Maintenance and Propagation of Phytoplasmas in Glasshouse Collections of *Catharanthus roseus*. *Methods Mol Biol*, 938: 15-32.
- Hodgetts J, Johnson G, Perkins K, Ostoj-Starzewska S, Boonham N, Mumford R and Dickinson M. (2014). The Development of Monoclonal Antibodies to the *secA* Protein of Cape St. Paul Wilt Disease Phytoplasma and Their Evaluation as a Diagnostic Tool. *Mol Biotechnol*, 56:803–813.
- Hogenhout SA, Oshima K, Ammar ED, Kakizawa S, Kingdom HN and Namba S. (2008). Phytoplasmas: bacteria that manipulate plants and insects. *Mol Plant Pathol*, 9:403–423.
- Holguín-Peña RJ and Vázquez-Juárez RC. (2007). First Report of a 16SrI-B Group Phytoplasma Associated with a Yellows-Type Disease Affecting Tomato Plants in the Baja California Peninsula of Mexico. *Plant Dis*, 91:328.

- Hoshi A, Oshima K, Kakizawa S, Ishii Y, Ozeki J, Hashimoto M, Komatsu K, Kagiwada S, Yamaji Y and Namba S. (2009). A unique virulence factor for proliferation and dwarfism in plants identified from a phytopathogenic bacterium. *PNAS*, 106:6416–6421.
- International Committee on Systematic Bacteriology-Subcommittee on the Taxonomy of Mollicutes. (1997). Minutes of the interim meetings. 12 and 18 July 1996, Orlando, Florida, USA. *Int J Syst Evol Microbiol*, 47:911-914.
- International Committee on Systematic Bacteriology-Subcommittee on the Taxonomy of Mollicutes. (1995). Revised minimum standards for description of new species of the Class Mollicutes (Division Tenericutes). *Int J Syst Evol Microbiol*, 45:605-612.
- International Committee on Systematic Bacteriology-Subcommittee on the Taxonomy of Mollicutes. (1993). Minutes of the interim meetings, 1 and 2 August 1992, Ames, Iowa. *Int J Syst Evol Microbiol*, 43:394-397.
- Jarausch W, Angelini E, Eveillard S, Malembic-Maher S. (2013). Management of European fruit tree and grapevine phytoplasma diseases through genetic resistance. *Phytopathogenic Mollicutes*, 3: 16-24.
- Jomantiene R and Davis RE. (2006). Clusters of diverse genes existing as multiple, sequence-variable mosaics in the phytoplasma genome. *FEMS Microbiol Lett*, 255:59–65.
- Jomantiene R, Davis RE, Maas J and Dally EL. (1998). Classification of new phytoplasmas associated with diseases of strawberry in Florida, based on analysis of 16S rRNA and ribosomal protein gene operon sequences. *Int J Syst Bacteriol*, 48: 269–77.
- Jomantiene R, Maas JL, Dally EL and Davis RE. (1999). First Report of Clover Yellow Edge and STRAWB2 Phytoplasmas in Strawberry in Maryland. *Plant Dis*. 83:1072- 1072.
- Jomantiene R, Zhao Y, Davis RE. (2007). Sequence-variable mosaics: composites of recurrent transposition characterizing the genomes of phylogenetically diverse phytoplasmas. *DNA Cell Biol*, 26:557–564.
- Jomantiene RJ, Maas L, Davis RE and Dally EL. (2001). Molecular identification and classification of a phytoplasma associated with phyllody of strawberry fruit in Maryland. *Plant Dis*, 85:335.
- Jung HY, Sawayanagi T, Kakizawa S, Nishigawa H, Miyata S, Oshima K, Ugaki M, Lee JT, Hibi T and Namba, S. (2002). ‘*Candidatus* Phytoplasma castaneae’, a novel phytoplasma taxon associated with chestnut witches’ broom disease. *Int J Syst Evol Microbiol*, 52:1543–1549.

- Jung HY, Sawayanagi T, Wongkaew P, Kakizawa S, Nishigawa, H, Wei W, Oshima K, Miyata SI, Ugaki M and other authors (2003a). ‘*Candidatus Phytoplasma oryzae*’, a novel phytoplasma taxon associated with rice yellow dwarf disease. *Int J Syst Evol Microbiol*, 53:1925–1929.
- Jung HY, Sawayanagi T, Kakizawa S, Nishigawa H, Wei W, Oshima K, Miyata SI, Ugaki M, Hibi T and Namba S. (2003b). ‘*Candidatus Phytoplasma ziziphi*’, a novel phytoplasma taxon associated with jujube witches’-broom disease. *Int J Syst Evol Microbiol*, 53:1037–1041.
- Kakizawa S, Makino A, Ishii Y, Tamaki H and Kamagata Y. (2014). Draft genome sequence of “*Candidatus Phytoplasma asteris*” strain OY-V, an unculturable plantpathogenic bacterium. *Genome Announc*, 2(5): e00944-14. doi:10.1128/genomeA.00944-14.
- Kakizawa S, Oshima K, Ishii Y, Hoshi A, Maejima K, Jung HY, Yamaji Y and Namba S.(2009). Cloning of immunodominant membrane protein genes of phytoplasmas and their in planta expression. *FEMS Microbiol Lett*, 293:92–101.
- Kakizawa S, Oshima K and Namba S.(2006a).Diversity and functional importance of phytoplasma membrane proteins. *Trends Microbiol*, 14:254–256.
- Kakizawa S, Oshima K, Jung HY, Suzuki S, Nishigawa H, Arashida R, Miyata S, Ugaki M, Kishino H and Namba S. (2006b). Positive selection acting on a surface membrane protein of the plant-pathogenic phytoplasmas. *J Bacteriol*, 188:3424–8.
- Kakizawa S, Oshima K, Nishigawa H, Jung HY, Wei W and Suzuki S.(2004). Secretion of immunodominant membrane protein from on- ion yellows phytoplasma through the Sec protein-translocation system in Escherichia coli. *Microbiology*, 150: 135-42.
- Kakizawa S, Oshima K, Kuboyama T, Nishigawa H, Jung, H, Sawayanagi T and Namba S. (2001). Cloning and expression analysis of Phytoplasma protein translocation genes.*Mol Plant Microbe Int*, 14(9):1043–50.
- Kawakita H, Salki T, Wei W, Mitsubishi W, Watanabe K and Sato M. (2000). Identification of mulberry dwarf phytoplasmas in the genital organs and eggs of leafhopper *Hishimonoides sellatiformis*. *Phytopathology*, 90:909-914.
- Kirkpatrick BC and Smart CD. (1995). Phytoplasmas: Can phylogeny provide the means to understand pathogenicity? In *Advances in Botanical Research*, ed. JH Andrews, IC Tommerup, pp. 188–212. New York: Academic.
- Kirkpatrick BC, Stenger DC, Morris TJ and Purcell AH. (1987). Cloning and detection of DNA from a nonculturable plant pathogenic mycoplasma-like organism. *Science*, 238:197-200.

- Kirschbaum DS, Real E Borquez AM. (2012). Evolution of Argentina's strawberry transplant exports in the last decade. VII International Strawberry Symposium, 2012, Beijing, China pg.184.
- Kirschbaum DS, Honorato J and Cantliffe DJ. (2000). Strawberry waiting bed plants: A valid alternative to increase early and total yields in sub-tropical regions. *Sci Horti*, 84:83–90.
- Kube M, Mitrovic J, Duduk B, Rabus R and Seemuller E. (2012). Current view on phytoplasma genomes and encoded metabolism. *Scientific World J*, 2012:1–25.
- Kube M, Schneider B, Kuhl H, Dandekar T, Heitmann K, Migdoll AM, Reinhardt R and Seemüller E. (2008). The linear chromosome of the plant-pathogenic mycoplasma “*Candidatus* Phytoplasma mali. *BMC Genomics*, 9:306.
- Lee IM, Bottner-Parker KD, Zhao Y, Villalobos W and Moreira L. (2011). ‘*Candidatus* Phytoplasma costaricanum’ a novel phytoplasma associated with an emerging disease in soybean (*Glycine max*). *Int J Syst Evol Microbiol*, 61, 2822–2826.
- Lee, IM, Bottner-Parker KD, Zhao Y, Davis RE and Harrison N. (2010). Phylogenetic analysis and delineation of phytoplasmas based on secY gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol*, 60:2887–97.
- Lee IM, Bottner KD, Secor G and Rivera-Varas V. (2006). ‘*Candidatus* Phytoplasma americanum’, a phytoplasma associated with a potato purple top wilt disease complex. *Int J Syst Evol Microbiol*, 56:1593–1597.
- Lee IM, Gundersen-Rindal DE, Davis RE, Bottner KD, Marcone C and Seemüller E. (2004a). ‘*Candidatus* Phytoplasma asteris’, a novel phytoplasma taxon associated with aster yellows and related diseases. *Int J Syst Evol Microbiol*, 54:1037–1048.
- Lee IM, Martini M, Marcone C and Zhu SF. (2004b). Classification of phytoplasma strains in the elm yellows group (16SrV) and proposal of ‘*Candidatus* Phytoplasma ulmi’ for the phytoplasma associated with elm yellows. *Int J Syst Evol Microbiol*, 54:337–347.
- Lee I, Davis RE and Dawn E. (2000). PHYTOPLASMA : Phytopathogenic Mollicutes. *Annu. Rev. Microbiol*, 54:221–255.
- Lee I, Gundersen-rindal DE, Davis RE and Bartoszyk IM. (1998a). Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol*, 48:1153–1169.
- Lee IM, Gundersen DE and Bertaccini A. (1998b). Phytoplasma: Ecology and Genomic Diversity. *Phytopathology*, 88 (12):1359-1366.

- Lee IM, Bertaccini A, Vibio M and Gundersen DE.(1995). Detection of multiple phytoplasmas in perennial fruit trees with decline symptoms in Italy.*Phytopathology*, 85(6):728-735.
- Lee I-M, Gundersen DE, Hammond RW and Davis RE 1994. Use of mycoplasma-like organism (MLO) group-specific oligonucleotide primers for nested-PCR assays to detect mixed-MLO infections in a single host plant. *Phytopathology*, 84: 559-566.
- Lee IM, Hammond RW, Davis RE and Gundersen DE. (1993). Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of MLOs.*Phytopathology* 83:834–842.
- Lee IM, Davis RE, Chen TA, Chiykowski LN, Fletcher J, Hiruki C and Schaff DA.(1992). A genotype-based system for identification and classification of mycoplasma-like organisms (MLOs) in the Aster yellows MLO strain cluster. *Phytopathology*, 82:977-986.
- Lim PO and Sears BB. (1992). Evolutionary Relationships of a Plant-Pathogenic Mycoplasma-like Organism and *Acholeplasma laidlawii* Deduced from Two Ribosomal Protein Gene Sequences. *J Bacteriol*, 174:2606-2611.
- Lim PO and Sears BB. (1989). 16S rRNA sequence indicates that plant-pathogenic mycoplasma-like organisms are evolutionarily distinct from animal mycoplasmas. *J Bacteriol*, 171(11):5901-5906.
- Lowry HO, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent.*J. Biol. Chem*, 193:265-275.
- Lu Q and Xia Z. (2012). Cloning and characterization of the immunodominant membrane protein of mulberry yellow dwarf phytoplasma. *Afr J Biotechnol*, 11: 14399–14404.
- Ludwig W and Klenk HP. (2010). Overview: A phylogenetic backbone and taxonomic framework for prokaryotic systematics. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Eds. Krieg, N.R. Springer 4, pp. 49-65.
- Mass JL. (1998). *Compendium of Strawberry Diseases*. 2nd ed. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
- MacLean AM, Sugio A, Makarova OV, Findlay KC, Grieve VM, Toth R, Nicolaisen M and Hogenhout SA. (2011). Phytoplasma effector SAP54 induces indeterminate leaf-like flower development in Arabidopsis plants. *Plant Physiol*, 157:831–841.
- Malembic-Maher S, Salar P, Filippin L, Carle P, Angelini E and Foissac X. (2011). Genetic diversity of European phytoplasmas of the 16SrV taxonomic group and proposal of *Candidatus Phytoplasma rubi*?. *Int J Syst Evol Microbiol*, 61:2129–2134.

- Marcone C, Gibb KS, Streten C, and Schneider B. (2004a). ‘*Candidatus* Phytoplasma spartii’, ‘*Candidatus* Phytoplasma rhamni’ and ‘*Candidatus* Phytoplasma allocasuarinae’, respectively associated with spartium witches’-broom, buckthorn witches’-broom and allocasuarina yellows diseases. *Int J Syst Evol Microbiol*, 54: 1025–1029.
- Marcone C, Schneider B, and Seemüller E. (2004b). ‘*Candidatus* Phytoplasma cynodontis’, the phytoplasma associated with Bermuda grass white leaf disease. *Int J Syst Evol Microbiol*, 54:1077–1082.
- Martini M, Marcone C, Mitrovic J, Maixner M, Delic D, Myrta A, Ermacora P, Bertaccini A and Duduk B. (2012). ‘*Candidatus* Phytoplasma convolvuli’, a new phytoplasma taxon associated with bindweed yellows in four European countries. *Int J Syst Evol Microbiol*, 62:2910–2915.
- Martini M, Lee IM, Bottner KD, Zhao Y, Botti S, Bertaccini A, Harrison N, Carraro L, Marcone C, Khan AJ, and Osler R. (2007). Ribosomal protein gene-based phylogeny for finer differentiation and classification of phytoplasmas. *Int J Syst Evol Microbiol*, 57:2037-2051.
- Matsuoka K, Brune A, Ansani A and Carvalho MG. (1986). Association of a mycoplasma-like organism with *Melia azedarach* in Paraguay. *Revista Avore*, 10:202–206.
- McCoy RE, Caudwell A, Chang CJ, Chen T-A, Chykowski LN, Cousin MT, Dale JL, de Leeuw JT, Golino DA, Hackett KJ, Kirkpatrick BC, Marwitz R, Petzold H, Sinha RC, Sugiura M, Whitcomb RF, Yang YL, Zhu BM and Seemüller E.(1989). Plant diseases associated with mycoplasma-like organisms In: Whitcomb RF and Tully JG (eds) *The Mycoplasmas Vol V* Academic Press New York pp 546-640.
- MacKenzie SJ, Legard DE, Timmer LW, Chandler CK and Peres NA, (2006). Resistance of strawberry cultivars to crown rot caused by *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from Florida is nonspecific. *Plant Dis*, 90:1091–1097.
- McLean A, Orlovskis Z, Kowitwanich K, Zdziarska A, Angenent G, Immink R Hogenhout S. (2014). Phytoplasma Effector SAP54 Hijacks Plant Reproduction by Degrading MADS-box Protein and Promotes Insects Colonization in a RAD23-Dependent Manner. *PLOS Biology*, 12 (4), e1001835, doi:10.1371/journal.pbio.1001835.
- Melo L, Silva E, Flores D, Ventura J, Costa H and Bedendo I. (2013). A phytoplasma representative of a new subgroup, 16SrXIII-E, associated with Papaya apical curl necrosis. *Eur J Plant Pathol*, 3:445-450.
- Mello A, Eckstein B, Flores D, Kreyci PF and Bedendo IP. (2011). Identification by computer-simulated RFLP of phytoplasmas associated with eggplant giant calyx representative of two subgroups, a lineage of 16SrIII-J and the new subgroup 16SrIII-U. *Int J Syst Evol Microbiol*, 61:1454–1461.

- Mello A, Bedendo IP and Camargo L. (2006). Sequence Heterogeneity in the 16S rDNA of Tomato Big Bud Phytoplasma Belonging to Group 16SrIII. *J Phytopathol*, 154:245–249.
- Meneguzzi N. (2009). Caracterización molecular, taxonomía y diagnóstico de fitoplasmas del grupo Ash Yellows (VII). Tesis doctoral, FCEFYN, UNC. 146pp.
- Meneguzzi N, Torres LE, Galdeano E, Guzmán FA, Nome SF and Conci LR. (2008). Molecular characterization of a phytoplasma of the ash yellows group (16Sr VII-B) occurring in *Artemisia annua* and *Conyza bonariensis* weeds. *AGRISCIENTIA*, 25:7–15.
- Milne RG, Ramassso E, Lenzi R, Masenga V, Sarindu N and Clark MF. (1995). Pre- and post-embedding immunogold labelling and electron microscopy in plant host tissues of three antigenically unrelated MLOs: primula yellows, tomato big bud and bermudagrass white leaf. *Eur. J. Plant Pathol.* 101:57–67.
- Mitrović J, Siewert C, Duduk B, Hecht J, Mölling K, Broecker F, Beyerlein P, Büttner C, Bertaccini A and Kube M. (2014). Generation and Analysis of Draft Sequences of ‘Stolbur’ Phytoplasma from Multiple Displacement Amplification Templates. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 24:1-11.
- Mitrovic J, Kakizawa S, Duduk B, Oshima K, Namba S and Bertaccini A. (2011). The cpn60 gene as an additional marker for finer differentiation of ‘Candidatus Phytoplasma asteris’ related strains. *Annals of Applied Biology*, 159: 41-48.
- Molina N, Giménez L yRichieri C. (2007). Economía del Sector Hortícola de Corrientes Producción frutillera regional y su relación con la oferta nacional y del MERCOSUR. Publicación de la EEA Bella Vista Serie Técnica N° 22, ISSN 1515-9299.
- Montano HG, Bertacinni A, Pimentel J, Paltrinieri S and Contaldo N. (2014). Erigeron *Conyza bonariensis*, a host of ‘Candidatus Phytoplasma fraxini’-related strain in Brazil. *Phytopathogenic Mollicutes*, 4:72-76.
- Montano HG, Davis RE, Dally EL, Hogenhout S, Pimentel P and Brioso PST. (2001). ‘Candidatus Phytoplasma brasiliense’, a new phytoplasma taxon associated with hibiscus witches’-broom disease. *Int J Syst Evol Microbiol*, 51:1109–1118.
- Montano HG, Davis RE, Dally EL, Pimentel JP and Brioso PST. (2000). Identification and phylogenetic analysis of new phytoplasma from diseased chayote in Brazil. *Plant Dis*, 84:429–436.
- Morton A, Davies DL, Blomquist CL and Barbara DJ. (2003). Characterization of homologues of the apple proliferation immunodominant membrane protein gene from three related phytoplasmas. *Mol Plant Pathol*, 4:109–114.

- Muñoz JO, Nome SF and Kitajima EW. (1987). A mycoplasma like organism associated with yellows of *Melia azedarach*. *Fitopatol Bras*, 12:95–97.
- Munyanzeza JE, Crosslin JM and Upton JE. (2007). Association of *Bactericera cockerelli* (Homoptera: Psyllidae) with “zebra chip,” a new potato disease in southwestern United States and Mexico. *J Econ Entomol*, 100:656–663.
- Murray RGE and Stackebrandt E. (1995). Taxonomic note: implementation of the provisional status *Candidatus* for incompletely described procaryotes. *Int J Syst Bacteriol*, 45:186–187.
- Murray RGE and Schleifer KH. (1994). Taxonomic notes: a proposal for recording the properties of putative taxa of procaryotes. *Int J Syst Bacteriol*, 44:174–176.
- Muse SV and Gaut BS. (1994). A likelihood approach for comparing synonymous and nonsynonymous nucleotide substitution rates, with application to the chloroplast genome. *Mol Biol Evol*, 11:715–724.
- Nei M and Li WH. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *PNAS*, 76:5269–5273.
- Nejat N and Vadamalai G. (2013). Diagnostic techniques for detection of phytoplasma diseases: past and present. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 120:16–25.
- Nejat N, Vadamalai G, Davis RE, Harrison NA, Sijam K, Dickinson M, Abdullah SNA, and Zhao Y. (2013). ‘*Candidatus* Phytoplasma malaysianum’, a novel taxon associated with virescence and phyllody of Madagascar periwinkle (*Catharanthus roseus*). *Int J Syst Evol Microbiol*, 63:540–548.
- Neriya Y, Sugawara K, Maejima K, Hashimoto M, Komatsu K, Minato N, Miura C, Kakizawa S, Yamaji Y, Oshima K and Namba S. (2011). Cloning, expression analysis, and sequence diversity of genes encoding two different immunodominant membrane proteins in poinsettia branch-inducing phytoplasma (PoiBI). *FEMS Microbiol Lett*, 324:38–47.
- Nishigawa, Oshima K, Kakizawa S, Jung HY, Kuboyama T, Miyata S, Ugaki M. and Namba S. (2002a). A plasmid from a noninsect-transmissible line of a phytoplasma lacks two open reading frames that exist in the plasmid from the wild-type line. *Gene*, 298:195–201.
- Nunes CF, Ferreira J, Nunes Fernandez MC, Breves S, Generoso A, Soares BD, Carvalho Dias P, Borem P, and Cancado GA. (2011). An improved method for genomic DNA extraction from strawberry leaves. *Ciencia Rural*, 41: 1383–1389. Oshima K, Kakizawa S, Nishigawa H, Jung H-Y, Wei W, Suzuki S, Arashida R, Nakata D, Miyata S, Ugaki M, and Namba S. (2004). Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of a plant-pathogenic phytoplasma. *Nat Genet*, 36:27–29.

- Oshima K, Miyata S, Sawayanagi T, Kakizawa S, Nishigawa H, Jung HY, Furuki K, Yanazaki M, Suzuki S, Wei W, Kuboyama T, Ugaki M and Namba S. (2002). Minimal set of metabolic pathways suggested from the genome of onion yellows phytoplasma. *J Gen Plant Pathol*, 68:225–236.
- Oshima K, Maejima K, and Namba S. (2013). Genomic and evolutionary aspects of phytoplasmas. *Frontiers in Microbiology*, 4:1-8.
- Padovan A, Gibb K and Persley D. (2000). Association of ‘*Candidatus* Phytoplasma australiense’ with green petal and lethal yellows diseases in strawberry. *Plant Pathol*, 49:362–369.
- Pohlschroder M, Prinz WA, Hartmann E and Beckwith J. (1997). Protein translocation in the three domains of life: Variations on a theme. *Cell*, 91:563–566.
- Pérez-López E, Luna-Rodríguez M, Olivier CY, and Dumonceaux TJ. (2015). The underestimated diversity of phytoplasmas in Latin America. *Int J Syst Evol Microbiol*, doi: 10.1099/ijsem.0.000726.
- Porebski S, Bailey LG and Baum BR. (1997). Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharides and polyphenol component. *Plant Mol Biol Rep*, 15:8-15.
- Přibyllová J, and Spak J.(2013). Dodder transmission of phytoplasmas. *Methods Mol Biol*, 938:41-6.
- Quaglino F, Zhao Y, Casati P, Bulgari D, Bianco PA, Wei W, and Davis RE. (2013). ‘*Candidatus* Phytoplasma solani’, a novel taxon associated with stolbur- and bois noir-related diseases of plants. *Int J Syst Evol Microbiol*, 63:2879–2894.
- Qui BS, Li HH, Sui CL and Jiu KX. (1998). Amplification of phytoplasma 16SrDNA from 20 infected plants in China and their RFLP analysis. *Sci Silvae Sin*, 34:67–74.
- Rashidi M, Galetto L, Bosco D, Bulgarelli A, Vallino M, Veratti F, and Marzachi M. (2015). Role of the major antigenic membrane protein in phytoplasma transmission by two insect vector species. *BMC Microbiol*,
- Razin S. (2001). The genus *Mycoplasma* and related genera (Class Mollicutes). En: M. Anorkin et al. (eds) *The Prokaryotes: An evolving electronic resource for the microbiological community*, 3rd edition, release 3.7.
- Razin S, Yogev D and Naot Y. (1998). Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol Mol Biol R*, 62:1094-1196.
- Reporte Agroindustrial, Estadísticas y márgenes de cultivos Tucumanos. (2014). Actividad Comercial del cultivo de frutilla en Argentina y Tucumán, campaña 2014 vs 2013y gastos de producción en el 2014. Boletín N° 106, ISSN 2346-9102.

- Robinson IM and Freundt EA. (1987). Proposal for an amended classification of anaerobic mollicutes. *Int J Syst Bacteriol*, 32:78-81.
- Rosselló-Mora R and Amann R. (2001). The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev*, 25:39-67.
- Rupa BA, Azam NK, Mannan A, Ahmed N and Hasan N. (2014). Phytochemistry and Pharmacological Appraisals of Persian Lilac (*Melia azedarach* Linn): A Quick Comprehensive Review. *Am J Ethnomed*, 1:152–163.
- Saccardo F, Martini M, Palmano S, Ermacora P and Scortichini M. (2012). Genome drafts of four phytoplasma strains of the ribosomal group 16SrIII. *Microbiology*, 158: 2805–2814.
- Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis TA. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Santos-Cervantes, ME, Chávez-Medina JA, Acosta-Pardini J, Flores-Zamora GL, Méndez-Lozano J and Leyva-López NE. (2010). Genetic Diversity and Geographical Distribution of Phytoplasmas Associated with Potato Purple Top Disease in Mexico. *Plant Dis*, 94:388–395
- Sawayanagi T, Horikoshi N, Kanehira T, Shinohara M, Bertaccini A, Cousin MT, Hiruki C and Namba S. (1999). ‘*Candidatus Phytoplasma japonicum*’, a new phytoplasma taxon associated with Japanese Hydrangea phyllody. *Int J Syst Bacteriol*, 49:1275–1285.
- Schneider B, Torres E, Martin MP, Schröder M, Behnke HD and Seemüller E. (2005). ‘*Candidatus Phytoplasma pini*’, a novel taxon from *Pinus silvestris* and *Pinus halepensis*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 55:303–307.
- Schneider B, Gibb KS, and Seemüller E. (1997). Sequence and RFLP analysis of the elongation factor Tu gene used in differentiation and classification of phytoplasmas. *Microbiology*, 143: 3381-3389.
- Schneider B, Seemüller E, Smart C D, and Kirkpatrick B. C. (1995). Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas. In *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasma*, vol. I, pp. 369–380. Edited by R. Razin & J. G. Tully. San Diego: Academic Press.
- Sector Forestal 2013. (2014). Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. http://www.minagri.gob.ar/new/0-0/forestacion/_archivos/_econo/sector%20forestal%202013.pdf
- Seemüller E, and Schneider B. (2004). ‘*Candidatus Phytoplasma mali*’, ‘*Candidatus Phytoplasma pyri*’ and ‘*Candidatus Phytoplasma prunorum*’, the causal agents of apple proliferation, pear decline and European stone fruit yellows, respectively. *Int J Syst Evol Microbiol*, 54:1217–1226.

- SENASA. 2012. Certificaciones del Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) a productos de origen animal y vegetal. <http://www.senasa.gov.ar/estadistica.php>
- Shen WC and Lin CP. (1993). Production of monoclonal-antibodies against a mycoplasma-like organism associated with sweet-potato witches-broom. *Phytopathology*, 83:671–675.
- Siampour M, Izadpanah K, Galetto L and Salehi M. (2013). Molecular characterization , phylogenetic comparison and serological relationship of the Imp protein of several “ *Candidatus* Phytoplasma aurantifolia ” strains. *Plant Pathol*, 62:452-459.
- Siddique ABM, Guthrie JN, Walsh KB, White DT and Scott PT. (1998). Histopathology and within-plant distribution of the phytoplasma associated with Australian papaya dieback. *Plant Dis*, 82:1112-1120.
- Sinha RC and Chiykowski LN. (1974). Purification and serological detection of mycoplasma like organism from plants affected by peach eastern-x disease. *Can. J. Plant Pathol*, 6:200-205.
- Silva E, Flores D, and Bedendo P. (2014). Bougainvillea Shoot Proliferation, a New Disease Induced by Distinct Phytoplasmas. *J of Phytopathology*, 163:872-876.
- Strauss E. (2009). Phytoplasmas research begins to bloom. *Science*, 325: 388-390.
- Sugawara K, Honma Y, Komatsu K, Himeno M, Oshima K and Namba S. (2013). The alteration of plant morphology by small peptides released from the proteolytic processing of the bacterial peptide TENGU. *Plant Physiol*, 162:2005–2014.
- Sugio A, Maclean AM, Kingdom HN, Grieve VM, Manimekalai R and Hogenhout SA. (2011a). Diverse targets of phytoplasma effectors: from plant development to defense against insects. *Annu Rev Phytopathol*, 49:175–195.
- Sugio A, Kingdom HN, McLean A, Grieve V and Hogenhout, S. (2011b). Phytoplasma protein effector SAP11 enhances insect vector reproduction by manipulating plant development and defense hormone biosynthesis. *PNAS*, 108 (48):E1254–E1263.
- Suzuki S, Oshima K, Kakizawa S, Arashida R, Jung HY, Yamaji Y, Nishigawa H, Ugaki M and Namba S. (2006). Interaction between the membrane protein of a pathogen and insect microfilament complex determines insect-vector specificity. *PNAS*, 103:4252-4257.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A and Kumar S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol*, 30:2725-2729.
- Tedeschi R, Ferrato V, Rossi J and Alma A. (2006). Possible phytoplasma transovarial transmission in the psyllid *Cacopsylla melanoneura* and *Cacopsylla pruni*. *Plant Pathol*, 55:18-24.

- IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team–Phytoplasma taxonomy group (2004). “*Candidatus Phytoplasma*”, a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *Int J Syst Evol Microbiol*, 54:1243–55.
- Torres L, Galdeano E, Docampo D, and L. Conci. (2004). Characterization of an aster yellows phytoplasma associated with *Catharanthus* little leaf in Argentina. *J Plant Pathol* 86(3):209-214.
- Torres L, Galdeano E, Fernández F, Meneguzzi N and Conci L. (2011). Establishment of the new subgroup 16SrI-S (*rr-rp*) *tuf*-H belonging to ‘*Ca. Phytoplasma asteris*’ in wild and cultivated plants in Argentina. *J Plant Pathol* 93,:311-320.
- Tran-Nguyen LTT, Kube M, Schneider B, Reinhardt R Gibb KS . (2008). Comparative genome analysis of “*Candidatus Phytoplasma australiense*” (subgroup *tuf*-Australia I; *rp*-A) and “*Ca. Phytoplasma asteris*” strains OY-M and AY-WB. *J Bacteriol* , 190:3979–3991.
- Tully JG, Bove JM, Laigret F, Whitcomb RF. (1993). Revised taxonomy of the class Mollicutes: proposed elevation of a monophyletic cluster of arthropod-associated mollicutes to ordinal rank (Entomoplasmatales ord. nov.), with provision for familial rank to separate species with nonhelical morphology (Entomoplasmataceae fam. nov.) from helical species (Spiroplasmataceae), and emended descriptions of the order Mycoplasmatales, family Mycoplasmataceae. *Int J Syst Bacteriol*, 43:378-385.
- Valiunas D, Staniulis J and Davis RE. (2006). ‘*Candidatus Phytoplasma fragariae*’, a novel phytoplasma taxon discovered in yellows diseased strawberry, *Fragaria x ananassa*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 56:277–281.
- Vázquez A, Ducasse DA, Nome SF and Muñoz JO. (1983). Declinamiento del paraíso (*Melia azedarach* L.), síntomas y estudios etiológicos de esta nueva enfermedad. R. I. A. INTAXVIII, pp. 309–320
- Verdin E, Salar P, Danet JL, Choueiri E, Jreijiri F, El Zammar S, Gélie B, Bové JM, and Garnier M. (2003). ‘*Candidatus Phytoplasma phoenicium*’ sp. nov., a novel phytoplasma associated with an emerging lethal disease of almond trees in Lebanon and Iran. *Int J Syst Evol Microbiol*, 53:833–838.
- Wayne LG, Brenner DJ, Colwell RR, Grimont PAD, Kandler O, Krichevsky MI, Moore LH, Moore WEC, Murray RGE, Strackbrandt E, Starr MP and Truper HG. (1987). Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int J Syst Bacteriol*, 37:463-464.
- Wei W, Davis RE, Jomantiene R, and Zhao Y. (2008). Ancient, recurrent phage attacks and recombination shaped dynamic sequence-variable mosaics at the root of phytoplasma genome evolution. *PNAS*, 105:11827–11832.

- Wei W, Davis RE, Lee IM and Zhao Y. (2007). Computer simulated RFLP analysis of 16S rRNA genes: identification of ten new phytoplasma groups. *Int J Syst Bacteriol*, 57:1855-1867.
- Wei W, Kakizawa S, Jung HY, Suzuki S, Tanaka M, Nishigawa H, Miyata S, Oshima K, Ugaki M, Hibi Y and Namba S. (2004). An antibody against the SecA membrane protein of one phytoplasma reacts with those of phylogenetically different phytoplasmas. *Phytopathology*, 94:683-686.
- Weintraub PG, and Beanland L. (2006). Insect vectors of phytoplasmas. *Annu Rev Entomol*, 51:91-111.
- Whitcomb RF and Tully JG. (1989). Plant Diseases Associated with Mycoplasma-like Organisms, Academic Press, New York, pp. 546-640.
- Wilske B, Busch U, Fingerle V, Jauris-Heipke S, Preac Mursic V, Rössler D and Will G. (1996). Immunological and molecular variability of OspA and OspC. Implications for *Borrelia* vaccine development. *Infection*, 2:208-212.
- Win NKK, Lee SY, Bertaccini A, Namba S and Jung HY. (2012). 'Candidatus Phytoplasma balanitae' associated with witches' broom disease of *Balanites triflora*. *Int J Syst Evol Microbiol* 63:636-640.
- Woese CR, Maniloff J and Zablen LB. (1980). Phylogenetic analysis of the mycoplasmas. *PNAS*, 77:494-498.
- Yu Y, Yeh K and Chan-pin, L. (1998). An antigenic protein gene of a phytoplasma associated with sweet potato witches' broom. *Microbiology*, 144:1257-1262.
- Zhao Y, Davis RE, Wei W and Lee IM. (2015). Should 'Candidatus Phytoplasma' be retained within the Order Acholeplasmatales?. *Int J Syst Evol Microbiol*, 65:1075-1082.
- Zhao Y, Wei W, Lee IM, Shao J, Suo X and Davis RE. (2009a). Construction of an interactive online phytoplasma classification tool, iPhyClassifier, and its application in analysis of the peach X-disease phytoplasma group (16SrIII). *Int J Syst Evol Microbiol*, 59:2582-2593.
- Zhao Y, Sun Q, Wei W, Davis RE, Wu W and Liu Q. (2009b). 'Candidatus Phytoplasmatamaricis', a novel taxon discovered in witches'-broom-diseased salt cedar (*Tamarix chinensis* Lour.). *Int J Syst Evol Microbiol*, 59:2496-2504.
- Zreik L, Carle P, Bové JM, and Garnier M. (1995). Characterization of the mycoplasma-like organism associated with witches'-broom disease of lime and proposition of a *Candidatus* taxon for the organism, 'Candidatus Phytoplasma aurantifolia'. *Int J Syst Bacteriol*, 45:449-453.

Anexo

Tablas

Tabla 1: Frecuencias totales de plantas analizadas y plantas *EL* de para cada uno de los cultivares/viveros analizados en las 3 campañas (2010-2011 y 2012). N: número de plantas totales inspeccionadas visualmente, nEL: número total de plantas con sintomatología *EL* y nEL PCR (+): número total de plantas *EL* positivas para fitoplasmas mediante PCR.

| Cultivar | Vivero | N | nEL | nEL PCR (+) |
|--------------------------|---------------------------|--------------|-----------|-------------|
| Albion | Vivero Don Antonio | 400 | 3 | 0 |
| Albion | Vivero La Loma | 500 | 0 | 0 |
| Albion | Vivero Tafi del Valle | 350 | 0 | 0 |
| Albion | Vivero Vallejo | 400 | 0 | 0 |
| Benicia | Vivero Vallejo | 300 | 0 | 0 |
| Camarosa premiun | Vivero Vallejo | 500 | 0 | 0 |
| Camarosa superpremium | Vivero Don Antonio | 700 | 3 | 0 |
| Camarosa superpremium | Vivero Marcelo Fernandez | 1650 | 5 | 1 |
| Camarosa superpremium | Vivero Nicolas del Sel | 400 | 0 | 0 |
| Camarosa | Vivero Don Antonio | 1650 | 14 | 1 |
| Camarosa | Vivero La Loma | 1500 | 3 | 0 |
| Camarosa | Vivero Nicolas del Sel | 1900 | 12 | 1 |
| Camarosa | Vivero Patagonia (Esquel) | 1400 | 11 | 2 |
| Camarosa | Vivero Vallejo | 1400 | 4 | 0 |
| Camino Real planta madre | Vivero Nicolas del Sel | 400 | 0 | 0 |
| Camino Real | Vivero Don Antonio | 750 | 1 | 0 |
| Camino Real | Vivero La Loma | 900 | 1 | 0 |
| Camino Real | Vivero Nicolas del Sel | 1700 | 1 | 0 |
| Camino Real | Vivero Patagonia (Esquel) | 700 | 0 | 0 |
| Camino Real | Vivero Vallejo | 700 | 0 | 0 |
| Eliana | Vivero Viansa | 100 | 0 | 0 |
| Festival con hojas | Vivero Viansa | 300 | 0 | 0 |
| Festival | Vivero Marcelo Fernandez | 600 | 2 | 0 |
| Festival | Vivero Nicolas del Sel | 300 | 1 | 0 |
| Festival | Vivero Viansa | 800 | 0 | 0 |
| Fortuna | Vivero La Loma | 400 | 0 | 0 |
| Fortuna | Vivero Viansa | 900 | 3 | 1 |
| Mojave | Vivero Vallejo | 300 | 0 | 0 |
| Palomar | Vivero La Loma | 1000 | 0 | 0 |
| Portola | Vivero Vallejo | 300 | 0 | 0 |
| San andreas | Vivero La Loma | 500 | 0 | 0 |
| San andreas | Vivero Nicolas del Sel | 1000 | 2 | 0 |
| San andreas | Vivero Viansa | 300 | 0 | 0 |
| Totales | | 25000 | 66 | 6 |

Tabla 2: Listado de secuencias del gen 16Sr empleadas en los análisis de similitud, RFLP *in silico* y filogenia. En negrita la secuencia de los aislamientos obtenidos en esta tesis. †: aislamiento sin subgrupo definido, s/d: secuencias no subidas al GenBank, * coeficiente de similitud RFLP (F) ≤ 0,97 respecto del subgrupo denominado.

| Fitoplasma/aislamiento | Grupo-subgrupo 16Sr | Nº GenBank | Hospedante |
|---|---------------------|-----------------|--|
| Fitoplasmas relacionados al grupo 16SrXIII | | | |
| Mexican periwinkle virescence MPV | 16SrXIII-A | AF248960 | <i>Catharanthus roseus</i> |
| Strawberry stunting STRAWB1 | 16SrXIII-B | U96614 | <i>Fragaria x ananassa</i> |
| Chinaberry Yellows CbY1 | 16SrXIII-C | AF495882 | <i>Melia azedarach</i> |
| Mexican potato purple top phytoplasma SINPV | 16SrXIII-D | FJ914647 | <i>Solanum tuberosum</i> |
| Papaya apical curl necrosis PACNBr1 | 16SrXIII-E | JX893519 | <i>Carica papaya</i> |
| Papaya apical curl necrosis PACNBr2 | 16SrXIII-E | EU719111 | <i>Carica papaya</i> |
| Papaya apical curl necrosis PACNBr4 | 16SrXIII-E | JX893519 | <i>Carica papaya</i> |
| China tree yellows ChTYXIII-4 | 16SrXIII-C | DQ444264 | <i>Melia azedarach</i> |
| China tree yellows ChTYXIII-72 | 16SrXIII-C | DQ444265 | <i>Melia azedarach</i> |
| Cauliflower stunt phytoplasma CfS-Br03 | 16SrXIII-† | JN818844 | <i>Brassica oleracea</i> |
| Papaya apical curl necrosis CS-Br03 | 16SrXIII-† | JX893518 | <i>Carica papaya</i> |
| Strawberry phylloid fruit SFPBr2 | 16SrXIII-† | EU719108 | <i>Fragaria x ananassa</i> |
| Strawberry phylloid fruit SFPBr3 | 16SrXIII-† | EU719109 | <i>Fragaria x ananassa</i> |
| PPT-Potato2 | 16SrXIII-† | JN087521 | <i>Solanum tuberosum</i> |
| PPT-Tomato6 | 16SrXIII-† | KC329499 | <i>Solanum lycopersicum</i> |
| PPT-Pepper2 | 16SrXIII-† | Q745314 | <i>Capsicum annuum</i> |
| China tree yellows ChTYXIII-Mo3 | 16SrXIII-C | s/d | <i>Melia azedarach</i> |
| China tree yellows ChTYXIII-RS3 | 16SrXIII-C | s/d | <i>Melia azedarach</i> |
| China tree yellows ChTYXIII-Ce3 | 16SrXIII-C | s/d | <i>Melia azedarach</i> |
| China tree yellows ChTYXIII-Ya4 | 16SrXIII-C | s/d | <i>Melia azedarach</i> |
| China tree yellows ChTYXIII-It27 | 16SrXIII-C | s/d | <i>Melia azedarach</i> |
| Strawberry red leaf StrawRL-Tc1 | 16SrXIII-F | KJ921641 | <i>Fragaria x ananassa</i> |
| Strawberry red leaf StrawRL-Tc7 | 16SrXIII-F | KJ921642 | <i>Fragaria x ananassa</i> |
| Strawberry red leaf StrawRL-BV1 | 16SrXIII-F | KJ921643 | <i>Fragaria x ananassa</i> |
| Strawberry red leaf StrawRL-BV2 | 16SrXIII-F | KJ921644 | <i>Fragaria x ananassa</i> |
| EL-Tc2 | 16SrIII-J* | s/d | <i>Fragaria x ananassa</i> |
| EL-Tc4 | 16SrIII-J | s/d | <i>Fragaria x ananassa</i> |
| EL-Tc12 | 16SrXIII-A | s/d | <i>Fragaria x ananassa</i> |
| EL-Tc32 | 16SrXIII-A | s/d | <i>Fragaria x ananassa</i> |
| EL-Tc40 | 16SrXIII-A* | s/d | <i>Fragaria x ananassa</i> |
| EL-Tc53 | 16SrIII-X* | s/d | <i>Fragaria x ananassa</i> |
| EL-Tc75 | 16SrIII-X* | s/d | <i>Fragaria x ananassa</i> |
| Fitoplasmas relacionados al grupo 16SrIII | | | |
| China tree decline ChTDIII | 16SrIII-B | AY081817 | <i>Melia azedarach</i> |
| Caesalpinia little leaf CaesLL | 16SrIII-B | KC202812 | <i>Caesalpinia gilliesii</i> |
| Catharanthus little leaf CatLL | 16SrIII-B | KC412025 | <i>Catharanthus roseus</i> |
| Tomato little leaf TomLL | 16SrIII-B | KC412025 | <i>Solanum lycopersicum</i> |
| Garlic decline GDIII 16SrIII-J | 16SrIII-J | AY081816 | <i>Allium sativum</i> |
| Chayote witches' broom ChWB | 16SrIII-J | KP763468 | <i>Sechium edule</i> |
| Tomato reddening TomRed | 16SrIII-J | KC412031 | <i>Solanum lycopersicum</i> |
| Bellis virescence BellVir | 16SrIII-J | KC412024 | <i>Bellis perennis</i> |
| Cucurbita virescence CucVir | 16SrIII-J | KC412028 | <i>Cucurbita máxima</i> |
| Conyza witches' broom strain ConWB-A | 16SrIII-X | KC412028 | <i>Conyza bonaerensis</i> |
| Conyza witches' broom strain ConWB-B | 16SrIII-X | KC412026 | <i>Conyza bonaerensis</i> |
| Heterothalamus little leaf HetLL | 16SrIII-W | KC412027 | <i>Heterothalamus alienus</i> |
| Passion fruit witches'-broom PassWBBr4 | 16SrIII-V | GU292082 | <i>Passiflora edulis f. flavicarpa</i> |
| Cassava frogskin disease CFSY29 | 16SrIII-L | AY737647 | <i>Manihot esculenta</i> |
| Fitoplasmas relacionados al grupo 16SrVII | | | |
| Ca.Phytoplasma fraxini AshY1 | 16SrVII-A | AF092209 | <i>Fraxinus sp.</i> |
| Ca.Phytoplasma fraxini AshY3 | 16SrVII-A | AF105315 | <i>Fraxinus sp.</i> |
| Ca.Phytoplasma fraxini AshY5 | 16SrVII-A | AF105316 | <i>Fraxinus sp.</i> |
| Erigeon witches' broom EriWB | 16SrVII-B | AY034608 | <i>Erigeron sp.</i> |
| Artemisia witches' broom ArWBI | 16SrVII-B | DQ989178 | <i>Artemisia annua</i> |
| Artemisia witches' broom ArWBII | 16SrVII-B | DQ989179 | <i>Artemisia annua</i> |
| Artemisia witches' broom ArWBIII | 16SrVII-B | DQ989180 | <i>Artemisia annua</i> |
| Argentinean alfalfa witches' broom ArAWB | 16SrVII-C | AY147038 | <i>Medicago sativa</i> |
| EL-BV3 | 16SrVII-C* | s/d | <i>Fragaria x ananassa</i> |
| Argentinean Strawberry Phyllody ASP | 16SrVII-C | JN368423 | <i>Fragaria x ananassa</i> |
| Crotalaria juncea shoot proliferation CrSP-Br01 | 16SrVII-C | KC756947 | <i>Crotalaria juncea</i> |
| <i>Acholeplasma palmae</i> | - | L33734 | - |

Tabla 2: continuación

| Fitoplasma/aislamiento | Grupo-subgrupo 16Sr | Nº GenBank | Hospedante |
|--------------------------------------|---------------------|------------|----------------------------------|
| 'Candidatus Phytoplasmas sp.' | | | |
| 'Ca. Phytoplasma asteris' | 16SrI-B | M30790 | <i>Oenothera elata</i> |
| 'Ca. Phytoplasma australiense' | 16SrXII-B | L76865 | <i>Vitis vinifera</i> |
| 'Ca. Phytoplasma aurantifolia' | 16SrII-B | U15442 | <i>Catharantus roseus</i> |
| 'Ca. Phytoplasma fraxini' | 16SrVII-A | AF092209 | <i>Fraxinus spp.</i> |
| 'Ca. Phytoplasma japonicum' | 16SrXII-D | AB010425 | <i>Hydranga spp.</i> |
| 'Ca. Phytoplasma brasiliense' | 16SrXV-A | AF147708 | <i>Hisbiscus spp.</i> |
| 'Ca. Phytoplasma ulmi' | 16SrV-B | AY197655 | <i>Ulmus minor</i> |
| 'Ca. Phytoplasma ziziphi' | 16SrV-B | AB052876 | <i>Ziziphus jujuba</i> |
| 'Ca. Phytoplasma trifolii' | 16SrVI-A | AY390261 | <i>Trifolium hybridum</i> |
| 'Ca. Phytoplasma phoenicium' | 16SrIX-D | AF515636 | <i>Prunus dulcis</i> |
| 'Ca. Phytoplasma mali' | 16SrX-A | AJ542541 | <i>Malus domestica</i> |
| 'Ca. Phytoplasma spartii' | 16SrX-D | X92869 | <i>Spartium junceum</i> |
| 'Ca. Phytoplasma prunorum' | 16SrX-F | AJ542544 | <i>Prunus pérsica</i> |
| 'Ca. Phytoplasma oryzae' | 16SrXI-A | AB052873 | <i>Oryza sativa</i> |
| 'Ca. Phytoplasma fragariae' | 16SrXII-E | DQ086423 | <i>Fragaria x ananassa</i> |
| 'Ca. Phytoplasma cynodontis' | 16SrXIV-A | AJ550984 | <i>Cynodon dactylon</i> |
| 'Ca. Phytoplasma caricae' | 16SrXVII-A | AY725234 | <i>Carica papaya</i> |
| 'Ca. Phytoplasma americanum' | 16SrXVIII-A | DQ174122 | <i>Solanum lycopersicum</i> |
| 'Ca. Phytoplasma castaneae' | 16SrXIX-A | AB054986 | <i>Castanea, spp.</i> |
| 'Ca. Phytoplasma rhamnii' | 16SrXX-A | X76431 | <i>Rhamnus frangula</i> |
| 'Ca. Phytoplasma pini' | 16SrXXI-A | AJ632155 | <i>Pinus halepensis</i> |
| 'Ca. Phytoplasma allocasuarinae' | ND | AY135523 | <i>Allocasuarina muelleriana</i> |
| 'Ca. Phytoplasma lycopersici' | ND | EF199549 | <i>Solanum lycopersicum</i> |
| 'Ca. Phytoplasma omanense' | 16SrXXIX-A | EF666051 | <i>Cassia itálica</i> |
| 'Ca. Phytoplasma tamaricis' | 16SrXXX-A | FJ432664 | <i>Tamarix chinensis</i> |
| 'Ca. Phytoplasma costaricanum' | 16SrXXXI-A | HQ225630 | <i>Glycine max</i> |
| 'Ca. Phytoplasma malaysianum' | 16SrXXXII | EU371934 | <i>Catharanthus roseus</i> |
| 'Ca. Phytoplasma convolvuli' | ND | JN833705 | <i>Convolvulus arvensis</i> |
| 'Ca. Phytoplasma palmicola' | 16SrXXII-A | KF751387 | <i>Cocos nucifera</i> |
| 'Ca. Phytoplasma rubi' | 16SrV-D | AY197648 | <i>Rubus spp.</i> |
| 'Ca. Phytoplasma solani' | 16SrXII-A | AF248959 | <i>Vitis vinifera</i> |
| 'Ca. Phytoplasma balanitae' | ND | AB689678 | <i>Balanites triflora</i> |
| 'Ca. Phytoplasma graminis' | 16SrXVI-A | AY725228 | <i>Guines sugarcane</i> |
| 'Ca. Phytoplasma pruni' | 16SrIII-A | JQ044393 | <i>Prunus pérsica</i> |
| 'Ca. Phytoplasma prunorum' | 16SrX-F | AJ542544 | <i>Prunus pérsica</i> |
| 'Ca. Phytoplasma pyri' | 16SrX-C | AJ542543 | <i>Pyrus communis</i> |
| 'Ca. Phytoplasma sudamericanum' | 16SrVI-I | GU292081 | <i>Passiflora edulis</i> |

Tabla 4: Identidad nucleotídica del gen 16S rDNA entre aislamientos de fitoplasmas asociados al síntoma *EL* (con patrón RFLP para la enzima *Mse*I-16SrXIII) y secuencias representativas del grupo 16SrXIII. †: subgrupo no definido.

| Fitoplasma/Grupo16Sr | EL-Tc1 | EL-Tc7 | EL-Tc12 | EL-Tc32 | EL-Tc40 | EL-BV1 | EL-BV2 |
|-----------------------|--------|--------|---------|---------|---------|--------|--------|
| MPV 16SrXIII-A | 98.67 | 98.67 | 99.5 | 99.42 | 99.59 | 98.67 | 98.54 |
| STRAWB1 16SrXIII-B | 98.24 | 98.24 | 98.75 | 98.66 | 98.78 | 98.24 | 98.05 |
| CbY1 16SrXIII-C | 98.0 | 98.0 | 98.17 | 98.08 | 98.21 | 98.0 | 97.81 |
| SINPV 16SrXIII-D | 97.92 | 97.92 | 98.17 | 98.42 | 98.38 | 97.92 | 97.73 |
| PACNBr1 16SrXIII-E | 98.5 | 98.5 | 98.5 | 98.42 | 98.46 | 98.5 | 98.3 |
| ChTYXIII-4 16SrXIII-C | 98.5 | 98.5 | 98.67 | 98.58 | 98.70 | 98.5 | 98.3 |
| CfS-Br03 16SrXIII-† | 98.66 | 98.66 | 98.83 | 98.75 | 98.78 | 98.66 | 98.38 |
| CS-Br03 16SrXIII-† | 98.67 | 98.67 | 98.83 | 98.75 | 98.86 | 98.67 | 98.46 |
| SFPBr2 16SrXIII-† | 98.99 | 98.99 | 98.41 | 97.91 | 98.05 | 98.99 | 98.78 |
| SFPBr3 16SrXIII-† | 99.41 | 99.41 | 98.42 | 98.32 | 98.46 | 99.41 | 98.46 |

Tabla 5: Identidad nucleotídica del gen 16S rDNA entre aislamientos de fitoplasmas asociados al síntoma *EL* (con patrón RFLP para la enzima *MseI*-16SrIII) y secuencias representativas del grupo 16SrXIII.

| Fitoplasma-grupo 16Sr | EL-Tc53 | EL-Tc75 | EL-Tc2 | EL-Tc4 |
|------------------------------|----------------|----------------|---------------|---------------|
| ChTDIII 16SrIII-B | 98.72 | 98.56 | 98.64 | 98.64 |
| CaesLL 16SrIII-B | 98.72 | 98.64 | 98.64 | 98.64 |
| CatLL 16SrIII-B | 98.88 | 98.8 | 98.8 | 98.8 |
| TomLL 16SrIII-B | 98.96 | 98.88 | 98.88 | 98.88 |
| GDIII 16SrIII-J | 98.64 | 98.48 | 99.04 | 98.72 |
| ChWB 16SrIII-J | 98.8 | 98.72 | 98.88 | 98.88 |
| TomRed 16SrIII-J | 98.88 | 98.8 | 99.12 | 98.96 |
| BellVir 16SrIII-J | 97.91 | 97.99 | 98.55 | 98.39 |
| CucVir 16SrIII-J | 98.56 | 98.48 | 99.20 | 99.04 |
| ConWB-A 16SrIII-X | 99.36 | 99.28 | 98.31 | 98.31 |
| ConWB-B 16SrIII-X | 99.36 | 99.28 | 98.31 | 98.31 |
| HetLL 16SrIII-W | 99.44 | 99.36 | 98.23 | 98.23 |
| PassWBBr4 16SrIII-V | 98.88 | 98.8 | 98.8 | 98.88 |
| CFSDY29 16SrIII-L | 98.64 | 98.64 | 98.56 | 98.56 |

Tabla 6: Identidad nucleotídica del gen 16S rDNA entre aislamientos de fitoplasmas asociados al síntoma *EL* (con patrón RFLP para la enzima *MseI*-16SrVII) y secuencias representativas del grupo 16SrVII

| Fitoplasma-grupo 16Sr | EL-BV3 |
|------------------------------|---------------|
| AshY1 16SrVII-A | 98.00 |
| AshY3 16SrVII-A | 97.92 |
| AshY5 16SrVII-A | 98.00 |
| EriWB 16SrVII-B | 98.72 |
| ArWBI 16SrVII-B | 98.64 |
| ArWBII 16SrVII-B | 98.72 |
| ArWBIII 16SrVII-B | 98.72 |
| ArAWB 16SrVII-C | 99.68 |
| ASP 16SrVII-C | 99.20 |
| CrSP-Br01 16SrVII-C | 99.68 |

Tabla 7: Identidad nucleotídica de un fragmento del gen 16Sr (1.2kb) entre los distintos '*Ca. Phytoplasmas* sp.' descritos hasta el momento y el '*Ca. Phytoplasma meliae*' (secuencia referencia = ChTYXIII-Mo3).

| '<i>Ca. Phytoplasma</i> species' | % Identidad nucleotídica |
|--|---------------------------------|
| ' <i>Ca. Phytoplasma asteris</i> ' | 95,95 |
| ' <i>Ca. Phytoplasma australiense</i> ' | 96,03 |
| ' <i>Ca. Phytoplasma aurantifolia</i> ' | 90,21 |
| ' <i>Ca. Phytoplasma fraxini</i> ' | 90,53 |
| ' <i>Ca. Phytoplasma japonicum</i> ' | 95,47 |
| ' <i>Ca. Phytoplasma brasiliense</i> ' | 90,21 |
| ' <i>Ca. Phytoplasma ulmi</i> ' | 90,21 |
| ' <i>Ca. Phytoplasma ziziphi</i> ' | 89,61 |
| ' <i>Ca. Phytoplasma trifolii</i> ' | 90,94 |
| ' <i>Ca. Phytoplasma phoenicium</i> ' | 90,05 |
| ' <i>Ca. Phytoplasma mali</i> ' | 92,94 |
| ' <i>Ca. Phytoplasma spartii</i> ' | 92,54 |
| ' <i>Ca. Phytoplasma prunorum</i> ' | 92,61 |
| ' <i>Ca. Phytoplasma oryzae</i> ' | 89,83 |
| ' <i>Ca. Phytoplasma fragariae</i> ' | 96,44 |
| ' <i>Ca. Phytoplasma cynodontis</i> ' | 90,70 |
| ' <i>Ca. Phytoplasma caricae</i> ' | 93,93 |
| ' <i>Ca. Phytoplasma americanum</i> ' | 95,95 |
| ' <i>Ca. Phytoplasma castaneae</i> ' | 89,48 |
| ' <i>Ca. Phytoplasma rhamni</i> ' | 92,21 |
| ' <i>Ca. Phytoplasma pini</i> ' | 90,29 |
| ' <i>Ca. Phytoplasma allocasuarine</i> ' | 92,84 |
| ' <i>Ca. Phytoplasma lycopersici</i> ' | 93,28 |
| ' <i>Ca. Phytoplasma omanense</i> ' | 90,21 |
| ' <i>Ca. Phytoplasma tamaricis</i> ' | 90,21 |
| ' <i>Ca. Phytoplasma costaricanum</i> ' | 94,66 |
| ' <i>Ca. Phytoplasma malaysianum</i> ' | 91,10 |
| ' <i>Ca. Phytoplasma convolvuli</i> ' | 96,11 |
| ' <i>Ca. Phytoplasma palmicola</i> ' | 90,37 |
| ' <i>Ca. Phytoplasma rubi</i> ' | 89,97 |
| ' <i>Ca. Phytoplasma solani</i> ' | 95,95 |
| ' <i>Ca. Phytoplasma balanitae</i> ' | 89,72 |
| ' <i>Ca. Phytoplasma graminis</i> ' | 94,82 |
| ' <i>Ca. Phytoplasma pruni</i> ' | 91,26 |
| ' <i>Ca. Phytoplasma prunorum</i> ' | 92,61 |
| ' <i>Ca. Phytoplasma pyri</i> ' | 93,18 |
| ' <i>Ca. Phytoplasma sudamericanum</i> ' | 90,70 |

Tabla 8: Listado de secuencias de los genes rpLV-rpsC empleadas en los análisis filogenéticos del ‘*Ca. Phytoplasma meliae*’. En negrita las secuencias obtenidas en esta tesis.

| Fitoplasma | Grupo-subgrupo 16Sr | Nº Genbank |
|--|---------------------|------------|
| ‘ <i>Ca. Phytoplasma aurantifolia</i> ’ | 16SrII-B | EF186815 |
| ‘ <i>Ca. Phytoplasma australasiae</i> ’ | 16SrII-D | EF193373 |
| ‘ <i>Ca. Phytoplasma phoenicium</i> ’ | 16SrX-D | EF186803 |
| ‘ <i>Ca. Phytoplasma fraxini</i> ’ | 167SrVII-A | EF183492 |
| ‘ <i>Ca. Phytoplasma trifoli</i> ’ | 16SrVI-A | EF183486 |
| ‘ <i>Ca. Phytoplasma ulmi</i> ’ | 16SV-B | AY197675 |
| ‘ <i>Ca. Phytoplasma ziziphi</i> ’ | 16SrV-B | AY197681 |
| ‘ <i>Ca. Phytoplasma prunorum</i> ’ | 16SrX-F | EF193370 |
| ‘ <i>Ca. Phytoplasma mali</i> ’ | 16SrX-A | EF193366 |
| ‘ <i>Ca. Phytoplasma pyri</i> ’ | 16SrX-C | EF193370 |
| ‘ <i>Ca. Phytoplasma asteris</i> ’ | 16SrI-B | M74770 |
| ‘ <i>Ca. Phytoplasma solani</i> ’ | 16SrXII-A | JQ797662 |
| ‘ <i>Ca. Phytoplasma australiense</i> ’ | 16SrXII-B | NC_010544 |
| ‘ <i>Ca. Phytoplasma fragariae</i> ’ | 16SrXII-E | EU338446 |
| ‘ <i>Ca. Phytoplasma americanum</i> ’ | 16SrXVIII-A | EF193362 |
| Mexican periwinkle virescence MPV | 16SrXIII-A | EF193365 |
| STRAWB1 | 16SrXIII-B | U96615 |
| ‘<i>Ca. Phytoplasma meliae</i>’ (ChTYXIII-Mo3) | 16SrXIII-C | s/d |
| ‘<i>Ca. Phytoplasma meliae</i>’ (ChTYXIII-RS3) | 16SrXIII-C | s/d |
| ‘<i>Ca. Phytoplasma meliae</i>’ (ChTYXIII-Ce3) | 16SrXIII-C | s/d |
| ‘<i>Ca. Phytoplasma meliae</i>’ (ChTYXIII-Ya4) | 16SrXIII-C | s/d |
| ‘<i>Ca. Phytoplasma meliae</i>’ (ChTYXIII-It27) | 16SrXIII-C | s/d |
| <i>Acholeplasma palmae</i> | - | EF197116 |

Tabla 9: Listado de secuencias de gen secA empleadas en los análisis filogenéticos del ‘*Ca. Phytoplasma meliae*’. En negrita las secuencias obtenidas en esta tesis.

| Fitoplasma | Grupo-subgrupo 16Sr | Nº Genbank |
|--|---------------------|------------|
| ‘ <i>Ca. Phytoplasma asteris</i> ’ | 16SrI-B | EF186815 |
| ‘ <i>Ca. Phytoplasma australiense</i> ’ | 16SrXII-B | EF193373 |
| Green valley X GVX | 16SrIII-A | EU168733 |
| Peach western X PYLV | 16SrIII-A | EU168732 |
| Elm witches’-broom ULM | 16SrV-A | EU168741 |
| Catharanthus phyllody CPS | 16SrVI-C | EU168744 |
| Pigeon pea witches’-broom PWB | 16SrVI-A | EU168742 |
| Ghanaian Cape St Paul wilt CSPWDI | 16SrV-C | EU168740 |
| Coconut lethal yellowin LYPRI | 16SrIV-A | EU168738 |
| <i>Crotalaria saltiana</i> phyllody FBPSA | 16SrII-C | EU168726 |
| Soybean phyllody SOYP | 16SrII-C | EU168727 |
| Ipomoea phytoplasma IPO | 16SrII-D | EU168730 |
| Australian tomato big bud TBB | 16SrII-D | EU168729 |
| European stone fruit yellows ESFY | 16SrX-B | EU168749 |
| Stolbur of pepper STOL | 16SrXII-A | EU168752 |
| Cordylina phytoplasma | 16SrXII-B | EU16875 |
| Strawberry lethal yellows SLY | 16SrXII-B | CP002548 |
| Clover phyllody KVE | 16SrI-C | EU168722 |
| Cactus aster yellows CACT | 16SrI-B | EU168721 |
| ‘<i>Ca. Phytoplasma meliae</i>’ (ChTYXIII-Mo3) | 16SrXIII-C | s/d |
| ‘<i>Ca. Phytoplasma meliae</i>’ (ChTYXIII-RS3) | 16SrXIII-C | s/d |
| ‘<i>Ca. Phytoplasma meliae</i>’ (ChTYXIII-Ce3) | 16SrXIII-C | s/d |
| ‘<i>Ca. Phytoplasma meliae</i>’ (ChTYXIII-Ya4) | 16SrXIII-C | s/d |
| ‘<i>Ca. Phytoplasma meliae</i>’ (ChTYXIII-It27) | 16SrXIII-C | s/d |
| <i>Acholeplasma palmae</i> | - | EF197116 |

Tabla 10: Listado de codones analizados en el set de datos correspondientes a la proteína amp (en sus distintas regiones) de los aislamientos del fitoplasma ChTYXIII, y sus valores de dN-dS asociados.

| Region | Codon# | Codon Start | Triplete | dN-dS | Normalized dN-dS |
|--------|--------|-------------|----------|--------------|------------------|
| amp-E | 1 | 1 | ATG | 0 | 0 |
| amp-E | 2 | 4 | CAA | 0 | 0 |
| amp-E | 3 | 7 | AAC | 0 | 0 |
| amp-E | 4 | 10 | AAA | 0 | 0 |
| amp-E | 5 | 13 | AAC | 0,376814291 | 6,522497091 |
| amp-E | 6 | 16 | GTT | 0 | 0 |
| amp-E | 7 | 19 | CAA | 0 | 0 |
| amp-E | 8 | 22 | AAG | 0 | 0 |
| amp-E | 9 | 25 | TCT | 0 | 0 |
| amp-E | 10 | 28 | TTG | 0 | 0 |
| amp-E | 11 | 31 | ATT | 0 | 0 |
| amp-E | 12 | 34 | ACT | 0 | 0 |
| amp-E | 13 | 37 | AAA | 0 | 0 |
| amp-E | 14 | 40 | TTA | -1,526352318 | -26,42051746 |
| amp-E | 15 | 43 | ACT | 0 | 0 |
| amp-E | 16 | 46 | ACT | 0 | 0 |
| amp-E | 17 | 49 | TTA | 0 | 0 |
| amp-E | 18 | 52 | TTT | 0 | 0 |
| amp-E | 19 | 55 | GCT | 0 | 0 |
| amp-E | 20 | 58 | GTT | 0 | 0 |
| amp-E | 21 | 61 | ATT | 0 | 0 |
| amp-E | 22 | 64 | GCT | 0 | 0 |
| amp-E | 23 | 67 | TTA | 0 | 0 |
| amp-E | 24 | 70 | AGT | 0 | 0 |
| amp-E | 25 | 73 | TTA | 0 | 0 |
| amp-E | 26 | 76 | GGC | 0 | 0 |
| amp-E | 27 | 79 | TTA | 0 | 0 |
| amp-E | 28 | 82 | GTT | 0 | 0 |
| amp-E | 29 | 85 | GTT | 0 | 0 |
| amp-E | 30 | 88 | TCT | 0 | 0 |
| amp-E | 31 | 91 | TCT | 0 | 0 |
| amp-E | 32 | 94 | TCA | 0 | 0 |
| amp-E | 33 | 97 | GTT | 0 | 0 |
| amp-E | 34 | 100 | TTT | 0 | 0 |
| amp-E | 35 | 103 | GCT | 0 | 0 |
| amp-H | 36 | 106 | GTT | 0,5 | 8,654789968 |
| amp-H | 37 | 109 | AGT | 0 | 0 |
| amp-H | 38 | 112 | AAA | 0 | 0 |
| amp-H | 39 | 115 | GAC | 0 | 0 |
| amp-H | 40 | 118 | CTT | 0 | 0 |
| amp-H | 41 | 121 | AGT | 0 | 0 |
| amp-H | 42 | 124 | ACA | 0 | 0 |
| amp-H | 43 | 127 | TTA | 0 | 0 |
| amp-H | 44 | 130 | ACT | 0,491156353 | 8,501710145 |
| amp-H | 45 | 133 | GAC | 0 | 0 |
| amp-H | 46 | 136 | ACA | 0 | 0 |
| amp-H | 47 | 139 | GAA | 0 | 0 |

| | | | | | |
|-------|----|-----|-----|--------------|--------------|
| amp-H | 48 | 142 | AAA | 0 | 0 |
| amp-H | 49 | 145 | AAA | 0 | 0 |
| amp-H | 50 | 148 | GTA | 0 | 0 |
| amp-H | 51 | 151 | ACA | 0 | 0 |
| amp-H | 52 | 154 | TTG | 0 | 0 |
| amp-H | 53 | 157 | AAA | 0 | 0 |
| amp-H | 54 | 160 | GCA | 0 | 0 |
| amp-H | 55 | 163 | GAT | 0 | 0 |
| amp-H | 56 | 166 | GAT | 0 | 0 |
| amp-H | 57 | 169 | GCA | 0 | 0 |
| amp-H | 58 | 172 | GCT | 1 | 17,30957994 |
| amp-H | 59 | 175 | GAC | 0 | 0 |
| amp-H | 60 | 178 | AAA | -3,266668197 | -56,54465428 |
| amp-H | 61 | 181 | ACC | 0 | 0 |
| amp-H | 62 | 184 | AAA | 0 | 0 |
| amp-H | 63 | 187 | GTT | 0 | 0 |
| amp-H | 64 | 190 | GTA | 0 | 0 |
| amp-H | 65 | 193 | GCA | 0 | 0 |
| amp-H | 66 | 196 | GAA | 0 | 0 |
| amp-H | 67 | 199 | TTA | 0 | 0 |
| amp-H | 68 | 202 | AAA | 0 | 0 |
| amp-H | 69 | 205 | AAA | 0 | 0 |
| amp-H | 70 | 208 | GTT | 0 | 0 |
| amp-H | 71 | 211 | GAT | 0 | 0 |
| amp-H | 72 | 214 | TCT | 0 | 0 |
| amp-H | 73 | 217 | CTA | -1,210826222 | -20,95889329 |
| amp-H | 74 | 220 | AAA | 0,442737407 | 7,663598544 |
| amp-H | 75 | 223 | GAA | 0 | 0 |
| amp-H | 76 | 226 | ATT | 0 | 0 |
| amp-H | 77 | 229 | GCA | 0,5 | 8,654789968 |
| amp-H | 78 | 232 | GAA | 0 | 0 |
| amp-H | 79 | 235 | TCA | 0 | 0 |
| amp-H | 80 | 238 | GAT | 0 | 0 |
| amp-H | 81 | 241 | ATT | 0 | 0 |
| amp-H | 82 | 244 | GAT | 0 | 0 |
| amp-H | 83 | 247 | TCA | 0 | 0 |
| amp-H | 84 | 250 | GTT | 0 | 0 |
| amp-H | 85 | 253 | ACA | 0 | 0 |
| amp-H | 86 | 256 | CCA | 0 | 0 |
| amp-H | 87 | 259 | AGT | 0 | 0 |
| amp-H | 88 | 262 | ACT | -0,5 | -8,654789968 |
| amp-H | 89 | 265 | GAT | 0 | 0 |
| amp-H | 90 | 268 | AAA | 0 | 0 |
| amp-H | 91 | 271 | AGT | 0 | 0 |
| amp-H | 92 | 274 | AAA | 0 | 0 |
| amp-H | 93 | 277 | ATA | 0 | 0 |
| amp-H | 94 | 280 | ACA | 0 | 0 |
| amp-H | 95 | 283 | GTT | 0 | 0 |
| amp-H | 96 | 286 | AAA | 0 | 0 |
| amp-H | 97 | 289 | GCA | 0 | 0 |

| | | | | | |
|-------|-----|-----|-----|--------------|--------------|
| amp-H | 98 | 292 | AAT | 0,426956923 | 7,390444982 |
| amp-H | 99 | 295 | GCT | 0 | 0 |
| amp-H | 100 | 298 | GAT | 0 | 0 |
| amp-H | 101 | 301 | TCA | 0 | 0 |
| amp-H | 102 | 304 | AGT | 0 | 0 |
| amp-H | 103 | 307 | AAA | 0 | 0 |
| amp-H | 104 | 310 | GTT | 0 | 0 |
| amp-H | 105 | 313 | TCA | 0 | 0 |
| amp-H | 106 | 316 | GGA | 0 | 0 |
| amp-H | 107 | 319 | CAA | 0 | 0 |
| amp-H | 108 | 322 | GTT | 0 | 0 |
| amp-H | 109 | 325 | GAT | 0 | 0 |
| amp-H | 110 | 328 | TTA | 0 | 0 |
| amp-H | 111 | 331 | ACT | 0 | 0 |
| amp-H | 112 | 334 | CGT | 0 | 0 |
| amp-H | 113 | 337 | GTT | 0 | 0 |
| amp-H | 114 | 340 | GAT | 0 | 0 |
| amp-H | 115 | 343 | CCA | 0 | 0 |
| amp-H | 116 | 346 | AGT | 0 | 0 |
| amp-H | 117 | 349 | TCT | 0 | 0 |
| amp-H | 118 | 352 | GAC | 0 | 0 |
| amp-H | 119 | 355 | GCA | 0 | 0 |
| amp-H | 120 | 358 | GCT | 0 | 0 |
| amp-H | 121 | 361 | AAA | 0 | 0 |
| amp-H | 122 | 364 | GCA | 0 | 0 |
| amp-H | 123 | 367 | GCA | 0 | 0 |
| amp-H | 124 | 370 | GCG | 0 | 0 |
| amp-H | 125 | 373 | GAA | 0 | 0 |
| amp-H | 126 | 376 | AAA | 0 | 0 |
| amp-H | 127 | 379 | TGG | 0 | 0 |
| amp-H | 128 | 382 | TAT | 0 | 0 |
| amp-H | 129 | 385 | GCA | 0 | 0 |
| amp-H | 130 | 388 | AAA | 0 | 0 |
| amp-T | 131 | 391 | TGG | 0 | 0 |
| amp-T | 132 | 394 | TGG | 0 | 0 |
| amp-T | 133 | 397 | GTT | 0 | 0 |
| amp-T | 134 | 400 | TGG | 0 | 0 |
| amp-T | 135 | 403 | GCT | 0 | 0 |
| amp-T | 136 | 406 | CTG | -0,742846662 | -12,85836367 |
| amp-T | 137 | 409 | GTT | -1 | -17,30957994 |
| amp-T | 138 | 412 | GCC | -0,5 | -8,654789968 |
| amp-T | 139 | 415 | ACT | 0,5 | 8,654789968 |
| amp-T | 140 | 418 | GTT | 0 | 0 |
| amp-T | 141 | 421 | GGT | 0,5 | 8,654789968 |
| amp-T | 142 | 424 | TGC | -0,282610572 | -4,891870288 |
| amp-T | 143 | 427 | GCC | -0,5 | -8,654789968 |
| amp-T | 144 | 430 | CTC | 0,4628332 | 8,011448268 |
| amp-T | 145 | 433 | ATC | 0 | 0 |
| amp-T | 146 | 436 | GGA | 0 | 0 |
| amp-T | 147 | 439 | GTT | 0 | 0 |

| | | | | | |
|-------|-----|-----|-----|---|---|
| amp-T | 148 | 442 | TCT | 0 | 0 |
| amp-T | 149 | 445 | TAC | 0 | 0 |
| amp-T | 150 | 448 | TAC | 0 | 0 |
| amp-T | 151 | 451 | GTT | 0 | 0 |
| amp-T | 152 | 457 | GTT | 0 | 0 |
| amp-T | 153 | 460 | AAA | 0 | 0 |
| amp-T | 154 | 463 | AAA | 0 | 0 |
| amp-T | 155 | 466 | AGA | 0 | 0 |
| amp-T | 156 | 469 | CAA | 0 | 0 |
| amp-T | 157 | 472 | CAA | 0 | 0 |
| amp-T | 158 | 475 | AAA | 0 | 0 |

Condiciones de PCR

- **Juego de primers rpF1/rpR1 (Lim y Sears, 1992)**

| | | | |
|-------------------|-----------|------|-------|
| Desnaturalización | 1 ciclo | 94°C | 3 min |
| Desnaturalización | | 94°C | 1 min |
| Hibridación | 35 ciclos | 54°C | 2 min |
| Síntesis | | 72°C | 2 min |
| Síntesis | 1 ciclo | 72°C | 5 min |

- **Juego de primer secA-ChTYFw1/secA-ChTYRv1 (esta tesis)**

| | | | |
|-------------------|-----------|------|--------|
| Desnaturalización | 1 ciclo | 95°C | 3 min |
| Desnaturalización | | 95°C | 30 seg |
| Hibridación | 35 ciclos | 56°C | 1 min |
| Síntesis | | 72°C | 1 min |
| Síntesis | 1 ciclo | 72°C | 10 min |

- **Juego de cebadores Rnc1-PssA1 (Kaskisawa et al., 2009)**

| | | | |
|-------------------|-----------|------|-------|
| Desnaturalización | 1 ciclo | 94°C | 3 min |
| Desnaturalización | | 94°C | 2 min |
| Hibridación | 40 ciclos | 58°C | 2 min |
| Síntesis | | 72°C | 5 min |
| Síntesis | 1 ciclo | 72°C | 10 in |

- **Juego de cebadores ES-1/nad-2 (Kakizawa et al., 2006b)**

| | | | |
|-------------------|-----------|------|--------|
| Desnaturalización | 1 ciclo | 94°C | 2 min |
| Desnaturalización | | 94°C | 2 min |
| Hibridación | 40 ciclos | 60°C | 2 min |
| Síntesis | | 72°C | 3 min |
| Síntesis | 1 ciclo | 72°C | 10 min |

- **Juego de primers groEL-Fw1/nadE-Rv2 (esta tesis)**

| | | | |
|-------------------|-----------|------|-------|
| Desnaturalización | 1 ciclo | 94°C | 2 min |
| Desnaturalización | | 94°C | 1 min |
| Hibridación | 35 ciclos | 58°C | 1 min |
| Síntesis | | 72°C | 3 min |
| Síntesis | 1 ciclo | 72°C | 10 in |

- **Juego de primers dnaD-Fw1/pyrG-Rv2 (esta tesis)**

| | | | |
|-------------------|-----------|------|--------------|
| Desnaturalización | 1 ciclo | 94°C | 3 min |
| Desnaturalización | | 94°C | 1 min |
| Hibridación | 35 ciclos | 56°C | 1 min |
| Síntesis | | 72°C | 1 min 30 seg |
| Síntesis | 1 ciclo | 72°C | 10 min |