



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE POSTGRADO

**“PROSPECCIÓN DE FITOPLASMAS EN CULTIVOS DE MANZANO
Y PERAL EN CHILE”**

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

ROSANY FACUNDO MEZA

Director de Tesis
NICOLA FIORE

Profesores Consejeros
JOSÉ LUIS HENRÍQUEZ SÁEZ
JAIME R. MONTEALEGRE ANDRADE

Prof. Colaborador
ALAN ZAMORANO CARRASCO

SANTIAGO-CHILE
2016

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE POSTGRADO

**“PROSPECCIÓN DE FITOPLASMAS EN CULTIVOS DE MANZANO Y
PERAL EN CHILE”**

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

ROSANY FACUNDO MEZA

Calificaciones

DIRECTOR DE TESIS

Nicola Fiore
Ingeniero Agrónomo, MS, Ph.D.

Aprobado

PROFESORES CONSEJEROS

José Luis Henríquez Sáez
Ingeniero Agrónomo, MS, Ph.D.

Aprobado

Jaime Montealegre Andrade
Ingeniero Agrónomo

Aprobado

Santiago, Chile
2016

Tesis financiada a través del Proyecto Fondecyt N° 1140883

Dedicada

A Dios y al Señor Cautivo:

Porque de no ser por su intervención, mi vida no sería tan maravillosa, con todos los retos, que con sabiduría me han impuesto y que con sus enseñanzas he logrado superar y aprender, porque en cada momento de mi vida han sido mi apoyo, mi refugio y fortaleza.

A mis Padres:

Josefa y José porque gracias a ellos he aprendido a luchar fielmente por mis convicciones, por inculcarme valores fundamentados en amor, comprensión y paciencia; porque ellos me han enseñado que las carencias no son sinónimo de conformismo, sino de lucha y de trabajo honrado, que aunque las cosas parecen difíciles, jamás serán imposibles.

A mis Hermanos:

Porque a pesar de la distancia y su silencio me tienen en su corazón.

Agradecimiento

Tengo mucho que agradecer a las personas que me han acompañado en este camino y han colaborado en mi realización personal.

Al Dr. Nicola Fiore, por aceptar dirigir este proyecto, y por su continuo interés y apoyo durante todo este tiempo.

Al Dr. Alan Zamorano, por el tiempo dedicado a esta tesis, por guiarme con entusiasmo e infinita paciencia hacia el camino de la investigación, pero sobre todo por su cercanía personal.

A la Dra. Lucía, por sus consejos, por estar dispuesta a resolver mis dudas que me han ido surgiendo.

A la señora Ana María, a Nicolás, a Paloma, a Claudia Rebolledo, a Claudia Abarca y a Gaby por esos buenos momentos vividos y por los que nos quedan. Y a todos los compañeros que han pasado por el laboratorio durante este tiempo. Gracias a ellos, todo ha sido más fácil y entretenido.

A mis padres por haber sido y ser el pilar a lo largo de todo este tiempo quienes sin entender de qué se trata me apoyaron incondicionalmente en este nuevo reto por levantarme en muchos momentos de desánimo.

A Ximena, Geovanny y Agustina por el apoyo, compañía y amistad recibida desde el primer día de clases. Aunque ha habido malos momentos igual me emociono al pensar en lo mucho que he compartido con ellas.

Por último, tengo mucho que agradecer a Juan, por ser uno de esos raros casos en los que la calidad humana y esfuerzo van de la mano, por hacer que con cada una de sus palabras todo parezca fácil.

«La ciencia no es más que un refinamiento del pensamiento cotidiano».

Albert Einstein (1879-1955)

Índice de contenido

	Página
CAPÍTULO I.....	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	1
Antecedentes generales	1
Enfermedades que afectan a los cultivos de manzano y peral.....	1
Fitoplasmas.....	2
Origen	2
Características generales.....	2
Sintomatología.....	3
Detección	4
Identificación y clasificación	4
Transmisión de fitoplasmas	5
Medidas de control.....	6
Distribución de fitoplasmas en el mundo	6
Importancia de las enfermedades causadas por fitoplasmas en las pomáceas	7
Situación de enfermedades causadas por fitoplasmas en Chile.....	7
BIBLIOGRAFIA	9
CAPÍTULO II	14
RESUMEN.....	14
ABSTRACT.....	15
INTRODUCCIÓN	16
HIPOTESIS.....	17
OBJETIVOS	17
Objetivo Específico	17
MATERIALES Y MÉTODOS	18
Colecta de material vegetal	18
Registro de síntomas	18
Extracción del DNA	18
Detección de fitoplasmas por PCR anidada	19
Gen tuf	19
Gen 16S rRNA.....	20
Electroforesis.....	21
Clonamiento	21
Ligación de los productos de PCR en el vector de clonación.....	21
Transformación de las células competentes.....	21
Obtención de secuencias	22

Identificación molecular y análisis bioinformático	22
RESULTADOS	23
Toma de muestras	23
Síntomas de las plantas de manzano y peral positivas a fitoplasmas	24
Detección de fitoplasmas por nested-PCR	27
Identificación de fitoplasmas por análisis de secuencia y RFLP <i>in silico</i>	27
DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.....	41
CONCLUSIONES	44
BIBLIOGRAFIA	45
APENDICE	49

Índice de tablas

	Página
Tabla 1. Partidores que se utilizaron para la detección del gen <i>tuf</i> propuestos por Makarova <i>et al.</i> (2012).....	20
Tabla 2. Partidores universales para la detección del gen <i>16S rRNA</i>	20
Tabla 3. Distribución de muestras colectadas por región.	23
Tabla 4. Síntomas observados en manzano y peral.....	24
Tabla 5. Comparación de los porcentajes de identidad nucleotídica del gen <i>tuf</i> entre las muestras chilenas y las referencias disponibles en GenBank.	29
Tabla 6. Fitoplasmas utilizados para la comparación de los porcentaje de similitud de secuencias nucleotídicas del gen <i>16S rRNA</i> entre las muestras de manzano y peral con los publicados en el GenBank.	35
Tabla 7. Síntomas de las plantas correspondientes a muestras positivas a fitoplasmas. Detección realizada en los genes <i>tuf</i> y <i>16S rRNA</i>	49

Índice de figuras

Página

Figura 1. Número de muestras tomadas en verano, otoño y primavera. Las porciones en celeste corresponden a las plantas con presencia de síntomas. Las porciones anaranjadas, representan a las plantas asintomáticas.	24
Figura 2. Síntomas en plantas de manzano. Izquierda proliferación de brotes en la variedad Fuji; derecha: hojas pequeñas y acucharadas en la variedad Royal Gala.	25
Figura 3. Síntomas observados en peral. Izquierda: hojas pequeñas y amarillas en la variedad Bosc; derecha: brazo muerto y hojas pequeñas.	25
Figura 4. Síntomas observados en peral: Izquierda enrojecimiento generalizado en la variedad D'Anjou; derecha: reducción de crecimiento en la variedad Williams.	26
Figura 5. Síntomas observados en peral variedad Williams. Izquierda: necrosis del floema; derecha: enrojecimiento de hojas.	26
Figura 6. Amplificación a través de Nested PCR con los partidores tuf400/tuf835 (gen <i>tuf</i>) de plantas de manzano (Pom176) y de peral (Pom136, Pom138, Pom243, Pom265 y Pom282); 100pb: marcador de peso molecular; B1: control negativo de PCR directo; B2: control negativo de nested PCR.	27
Figura 7. Amplificación a través de Nested PCR con los partidores R16F2n/R2 (gen <i>16S rRNA</i>) de plantas de peral (Pom136, Pom138, Pom243 y Pom265); 100pb: marcador de peso molecular; B1: control negativo de PCR directo; B2: control negativo del primer nested PCR; B3: control negativo del segundo nested PCR.	27
Figura 8. Árbol filogenético, basado en la comparación de secuencias nucleotídicas del gen <i>tuf</i> de fitoplasmas encontrados en las muestras de peral y manzano. La barra de escala representa una distancia genética relativa.	30
Figura 9. Análisis virtual en gel de poliacrilamida al 6% que muestra los perfiles de RFLP; obtenidos a partir de la digestión del gen <i>tuf</i> , con la enzima <i>MseI</i> , en muestras de manzano y peral. Secuencias de fitoplasma utilizadas como referencias: CX (16SrIII-A), CR (16SrIII-B), SP1 (16SrIII-E), MW1 (16SrIII-F), PoiLilo (16SrIII-H), Hort72 (16SrIII-J). Con las muestras: Pom78, Pom138, Pom282 (peral); Pom176, Pom262, Pom275 (manzano); M: marcador molecular.	31
Figura 10. Análisis virtual en gel de poliacrilamida al 6% que muestra los perfiles de RFLP; obtenidos a partir de la digestión del gen <i>tuf</i> , con la enzima <i>NdeII</i> , en muestras de manzano y peral. Secuencias de fitoplasma utilizadas como referencias: CX (16SrIII-A), CR (16SrIII-B), GR1 (16SrIII-D), SP1 (16SrIII-E), MW1 (16SrIII-F), PoiLilo (16SrIII-H), Hort72 (16SrIII-J). Con las muestras: Pom78, Pom138, Pom282 (peral); Pom176, Pom262, Pom275 (manzano); M: marcador molecular.	32
Figura 11. Análisis virtual en gel de poliacrilamida al 6% que muestra los perfiles de RFLP; obtenidos a partir de la digestión del gen <i>tuf</i> , con la enzima <i>Tsp509I</i> , en muestras de manzano y peral. Secuencias de fitoplasma utilizadas como referencias: CX (16SrIII-A), CR (16SrIII-B), GR1 (16SrIII-D), SP1 (16SrIII-E), MW1 (16SrIII-F), PoiLilo (16SrIII-H), Hort72 (16SrIII-J). Con las muestras: Pom78, Pom138, Pom282 (peral); Pom176, Pom262, Pom275 (manzano); M: marcador molecular.	33
Figura 12. Análisis virtual en gel de poliacrilamida al 6% que muestra los perfiles de RFLP; obtenidos a partir de la digestión del gen <i>tuf</i> , con la enzima <i>MseI</i> , en muestras de peral. Secuencias de fitoplasma utilizadas como referencia: AP-15 (16SrX-A), LNP (16SrX-B), PD (16SrX-C). Con las muestras de peral: Pom136, Pom242, Pom243, Pom265, Pom266; M: marcador molecular.	34
Figura 13. Árbol filogenético, basado en la comparación de secuencias nucleotídicas del gen <i>16S rRNA</i> de fitoplasmas encontrados en las muestras de peral. La barra de escala representa una distancia genética relativa.	35

Figura 14. Análisis virtual en gel de poliacrilamida al 6% que muestra los perfiles de RFLP; obtenidos a partir de la digestión del gen <i>16S rRNA</i> , con la enzima <i>MseI</i> , en muestras de peral. Secuencias de fitoplasma utilizadas como referencias: AP-15 (16SrX-A), LNP (16SrX-B), PD (16SrX-C). Con muestras de peral: Pom136, Pom243, Pom265 y Pom266; M: marcador molecular.	36
Figura 15. Análisis virtual en gel de poliacrilamida al 6% que muestra los perfiles de RFLP; obtenidos a partir de la digestión del gen <i>16S rRNA</i> , con la enzima <i>SspI</i> , en muestras de peral. Secuencias de fitoplasma utilizadas como referencias: AP-15 (16SrX-A), LNP (16SrX-B), PD (16SrX-C). Con muestras de peral: Pom136, Pom243, Pom265, Pom266; M: marcador molecular.	37
Figura 16. Análisis virtual en gel de poliacrilamida al 6% que muestra los perfiles de RFLP; obtenidos a partir de la digestión del gen <i>16S rRNA</i> , con la enzima <i>HhaI</i> , en muestras de peral. Secuencias de fitoplasma utilizadas como referencias: CX (16SrIII-A), CR (16SrIII-B), PB1 (16SrIII-C), GR1 (16SrIII-D), SP1 (16SrIII-E), MW1 (16SrIII-F), WWB (16SrIII-G), PoiLilo (16SrIII-H), VGYIII (16SrIII-I), Hort72 (16SrIII-J), SLF (16SrIII-K), FSDY17 (16SrIII-L), PPT-MT117-1 (16SrIII-M), PPT-AK6 (16SrIII-N), DanVir (16SrIII-O), DanVir (16SrIII-P), BRWB7 (16SrIII-Q), CirWL (16SrIII-R) y WX (16SrIII-S). Con la muestra de peral: Pom138; M: marcador molecular.	38
Figura 17. Análisis virtual en gel de poliacrilamida al 6% que muestra los perfiles de RFLP; obtenidos a partir de la digestión del gen <i>16S rRNA</i> , con la enzima <i>BstUI</i> , en muestras de peral. Secuencias de fitoplasmas utilizadas como referencias: CX (16SrIII-A), CR (16SrIII-B), PB1 (16SrIII-C), GR1 (16SrIII-D), SP1 (16SrIII-E), MW1 (16SrIII-F), WWB (16SrIII-G), PoiLilo (16SrIII-H), VGYIII (16SrIII-I), Hort72 (16SrIII-J), SLF (16SrIII-K), FSDY17 (16SrIII-L), PPT-MT117-1 (16SrIII-M), PPT-AK6 (16SrIII-N), DanVir (16SrIII-O), DanVir (16SrIII-P), BRWB7 (16SrIII-Q), CirWL (16SrIII-R) y WX (16SrIII-S) BRWB7 (16SrIII-Q). Con la muestra chilena de peral: Pom138; M: marcador molecular.	39
Figura 18. Análisis virtual en gel de poliacrilamida al 6% que muestra los perfiles de RFLP; obtenidos a partir de la digestión del gen <i>16S rRNA</i> , con la enzima <i>RsaI</i> , en muestras de peral. Secuencias de fitoplasma utilizadas como referencias: CX (16SrIII-A), CR (16SrIII-B), PB1 (16SrIII-C), GR1 (16SrIII-D), SP1 (16SrIII-E), MW1 (16SrIII-F), WWB (16SrIII-G), PoiLilo (16SrIII-H), VGYIII (16SrIII-I), Hort72 (16SrIII-J), SLF (16SrIII-K), FSDY17 (16SrIII-L), PPT-MT117-1 (16SrIII-M), PPT-AK6 (16SrIII-N), DanVir (16SrIII-O), DanVir (16SrIII-P), BRWB7 (16SrIII-Q), CirWL (16SrIII-R) y WX (16SrIII-S) BRWB7 (16SrIII-Q). Con la muestra de peral: Pom138; M: marcador molecular.	40

CAPÍTULO I

FITOPLASMAS ASOCIADOS AL CULTIVO DE MANZANO Y PERAL

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Antecedentes generales

Entre las pomáceas, las especies más cultivadas son el manzano (*Malus domestica* Borkh.) y el peral (*Pyrus communis* L.), siendo China el principal productor mundial. Sin embargo, Chile es un competidor importante en el comercio internacional de frutas, siendo reconocido como el principal abastecedor de fruta fresca del hemisferio sur. Cada año, los productos vegetales de más de 75 especies son enviados al exterior con destino a más de 100 países alrededor del mundo (ASVID, 2009).

En cuanto a las zonas de Chile, el manzano se produce desde la Región de Metropolitana hasta la de Aysén, con una superficie plantada que se concentra principalmente en las regiones del Maule (59,8%) y Libertador Bernardo O'Higgins (28,8%). En tanto el peral se produce desde la Región Metropolitana hasta la del Bío Bío, con el 50% del área plantada en la región del Libertador Bernardo O'Higgins (ASVID, 2009). Manzano y peral alcanzan el 22% de la producción de frutas en Chile. Sin embargo, el éxito y la rentabilidad depende, entre otros factores, de las condiciones fitosanitarias de estos dos cultivos.

Desde hace varios años la producción de manzanas y peras en Chile ha ido variando en cuanto a su perfil varietal, principalmente por la introducción de nuevas variedades, provocando un desplazamiento de las variedades antiguas o tradicionales. Estos cambios en la industria han sido influenciados por diferentes factores tales como el potencial productivo de cada variedad, la calidad de la fruta, las preferencias de los consumidores. Con ello, indirectamente también se ha favorecido el aumento del riesgo de introducir y/o diseminar nuevas enfermedades. Dada la importancia de estos dos cultivos para el mercado nacional como en las exportaciones, es necesario desarrollar estrategias de prevención de enfermedades.

Enfermedades que afectan a los cultivos de manzano y peral

El manzano y el peral se propagan vegetativamente y debido a la introducción de nuevas variedades y a la práctica de la alta densidad de plantación, aumenta considerablemente el riesgo de nuevas enfermedades.

En Chile, las principales enfermedades provocadas por bacterias son la agalla del cuello causada por *Rhizobium radiobacter* (Beijerinck and van Delden) y el tizón bacterial o tizón de la flor, causado por *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* van Hall (Latorre *et al.*, 2002a, b; Alvarez *et al.*, 2004).

Entre las principales enfermedades causadas por hongos, de mayor impacto económico en Chile y a nivel mundial se encuentra la sarna del manzano (*Venturia inaequalis* (Cooke) Wint), el cancro europeo del manzano y peral (*Nectria galligena* Bres), el cancro áspero o granuloso (*Botryosphaeria dothidea* Moug), el plateado del manzano (*Chondrostereum purpureum* (Pers.) Pouzar,) la pudrición calicinal (*Botrytis cinerea* Pers), la pudrición del fruto (*Penicillium expansum* Link), el oídio del manzano (*Podosphaera leucotricha* (Ellis y Everh) Salm.) y la pudrición lenticelar (*Neofabraea alba* (Guthrie) Verk.) (Alvarez *et al.*, 2004; Montealegre *et al.*, 2006; Pinilla, 2009). En

peral las enfermedades más recurrentes son la sarna (*Venturia pirina* Adreh), el cancro europeo (*Nectria galligena* Bres), la pudrición calicinal (*Botrytis cinerea* Pers) y la muerte de brazos (*Botryosphaeria obtusa* Schw) (Alvarez *et al.*, 2004).

Así mismo tanto en manzano como en peral, los virus y viroides más importantes en el mundo, respecto al daño económico causado, son *Apple mosaic virus* (ApMV), *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV), *Apple stem pitting virus* (ASPV) y *Apple stem grooving virus* (ASGV), *Apple scar skin viroid* (ASSVd) y *Pear blister canker viroid* (PBCVd) (Pūpola *et al.*, 2011). *Tomato ringspot virus* (ToRSV), ApMV, ASPV, ASGV, ACLSV, PBCVd y *Apple fruit crinkle viroid* (AFCVd) han sido detectados en Chile en manzano, peral y frutales de carozo (Fiore *et al.*, 2010; Méndez *et al.*, 2015).

'*Candidatus Phytoplasma mali*' en manzano y '*Candidatus Phytoplasma pyri*' en peral son las fitoplasmosis de mayor importancia en estos cultivos en el mundo (Seemüller y Schneider, 2004). En Chile no hay información acerca de la presencia de estos dos fitoplasmas.

Fitoplasmas

Origen

Los fitoplasmas se describieron por primera vez en 1967 por Doi, en el floema de plantas con amarilleces y se asociaron a procariontes morfológicamente parecidos a micoplasmas, denominándose “mycoplasma-like organisms” (MLOs). Los hallazgos de Doi *et al.* (1967) dieron lugar a un cambio drástico en la percepción de la etiología de muchas enfermedades por amarillamientos. En 1994, en el 10° Congreso de la Organización Internacional de Micoplasmología, el comité de taxonomía de los Mollicutes estableció el termino oficial para denominar a estos patógenos como “Phytoplasmas” sustituyendo de esta manera el término anterior (Cousin, 1995).

Características generales

Los fitoplasmas son bacterias fitopatógenas, taxonómicamente cercanas a las bacterias Gram +. Ambas contienen un bajo porcentaje guanina/citosina (G + C) y proceden de un ancestro común, pero a lo largo de su desarrollo los fitoplasmas fueron reduciendo su genoma y perdieron la pared celular (Woese *et al.*, 1980).

Estudios indican que los fitoplasmas se diferencian de las bacterias verdaderas por no poseer pared celular, estar rodeados por una membrana plasmática trilaminar, de aproximadamente unos 10 nm de grosor, compuesta de proteínas y lípidos; ser sensibles a la tetraciclina. Su citoplasma contiene ribosomas para la síntesis proteica, y una molécula de ADN doble cadena circular, habiéndose detectado también la presencia de ADN extra-cromosómico (Nishigawa *et al.*, 2001). Estos microorganismos tienen tamaños variables de 200 a 800 nm, son pleomórficos, es decir sin forma definida, aunque otros estudios revelan una morfología filamentosa. Estos microorganismos están limitados al hábitat intracelular. Viven y se multiplican en los tubos cribosos y en los tejidos de los insectos vectores. En las plantas se mueven a través del floema, en los insectos en el hemocele y las glándulas salivares. Dado que los fitoplasmas no tienen la capacidad genética de sintetizar todos los nutrientes necesarios para su metabolismo, éstos los adquieren de las células floemáticas, las cuales, al obturarse, provocan diversos desordenes en la planta infectada. Son procariontes con replicación autónoma, su genoma es bastante pequeño (680-1600 kb), rico en adenina y timina, se multiplican por

fisión binaria, gemación o fragmentación (Bertaccini *et al.*, 2014). A través de estudios serológicos y moleculares se observó que los fitoplasmas contienen un gen que codifica una proteína de membrana que es única para cada especie.

Sintomatología

Las plantas infectadas por fitoplasmas exhiben una alteración profunda del contenido del floema y un desorden del balance hormonal, por ejemplo, reducción de ácido indolacético, bloqueo de transporte de auxinas, incremento de precursores hormonales, presencia de inhibidores de síntesis de hormonas o alteraciones en el transporte y translocación de hormonas en la fotosíntesis y en las sustancias de reserva. Las alteraciones de las funciones del floema pueden ser causadas por la masiva infección fitoplasmática, la deposición de callosa en el floema, seguido de una necrosis y colapso de los tejidos conductores o los poros celulares cuya expresión de síntomas van a depender de la especie de planta y su resistencia (Lee *et al.*, 2000). La deposición de polisacáridos (por ejemplo callosa), es una respuesta de defensa celular por parte de la planta, pero esta deposición obstruye parcial o totalmente los plasmodesmos de las células de floema, lo cual limita la circulación normal de fitohormonas, enzimas y carbohidratos.

Los síntomas que presentan las plantas infectadas por fitoplasmas son diversos, dependiendo del momento de infección, tipo de fitoplasma, planta hospedera y genotipo del huésped. Los daños internos pueden causar necrosis de las células del floema y formación en exceso de tejido de floema, resultando en venas dilatadas (Lee *et al.*, 2000). Los daños externos típicos más frecuentes son amarillamientos o clorosis, proliferación de yemas adventicias que dan lugar al síntoma típico llamado “escoba de bruja”, virescencia (los pétalos adoptan un color verde), filodia (transformación de los órganos florales en estructuras foliares), esterilidad en las flores, enanismos generalizados, apariencia arbustiva en la parte terminal de los tallos, enrojecimiento precoz de las hojas, coloración rojiza a morada en el ápice de las hojas, muerte regresiva de ramas en plantas leñosas, retraso en el crecimiento, enrollamientos de las hojas y decaimiento general de la planta (Bertaccini, 2007). Recientemente se ha determinado que algunos síntomas similares pueden ser inducidos por diferentes tipos de dichos microorganismos; mientras que diferentes tipos de síntomas pueden ser inducidos por fitoplasmas estrechamente relacionados (Davis y Sinclair, 1998).

En Chile, se ha constatado que el fitoplasma 16SrIII-J transmitido por *Paratanus exitiosus* (Beamer) causa síntomas de virescencia, filodia y escoba de brujas en *Catharanthus roseus* (L.) G. Don (vinca rosea) (Fiore *et al.*, 2012).

Síntomas en manzano y peral

Los síntomas típicos de la enfermedad de la proliferación del manzano '*Candidatus Phytoplasma mali*' son: brotes delgados, corteza con estrías longitudinales de color marrón rojizo, crecimiento tardío de yemas terminales, desarrollo prematuro de las yemas axilares, pecíolos más cortos, retraso en la floración, filodia, menor calidad y tamaño de los frutos y frutos sin sabor, escoba de brujas, las hojas son generalmente más pequeñas y enrolladas, con estípulas inusualmente agrandadas. Los frutos son más pequeños y aplanados, y con pedúnculos alargados. También hay reducción del vigor del árbol, lo que aumenta la susceptibilidad al oídio. El enrojecimiento temprano de las

hojas es una buena indicación de la presencia del patógeno, aunque los fitoplasmas no son los responsables exclusivos de esta sintomatología (Bertaccini *et al.*, 2014).

“Rubbery wood” es una enfermedad importante del manzano en muchas partes del mundo, cuyos agentes etiológicos podrían ser los fitoplasmas. Los síntomas observados consisten en la flexibilidad inusual de tallos y ramas los que se desarrollan uno a tres años después de la infección (Ribeiro *et al.*, 2007, Jakovljevic *et al.*, 2015).

Los principales síntomas que causa '*Candidatus Phytoplasma pyri*' en peral son la muerte regresiva de los brotes, enrojecimiento prematuro y reducción de tamaños de las hojas las que pueden presentar márgenes ligeramente enrollados; se reduce la cuaja y la fruta no alcanza un buen calibre (Schneider, 1962). Los síntomas del decaimiento pueden ser similares a otros producidos por otros factores, tales como la incompatibilidad con el portainjerto, malas condiciones de drenaje, desnutrición, y la sequía.

Detección

La detección de los fitoplasmas es compleja, debido a su distribución errática en la planta y a la baja concentración de los mismos en los tejidos vegetales infectados (Gundersen y Lee, 1996; Green *et al.*, 1999). La detección se puede realizar a través de microscopía óptica (tinción DAPI) o electrónica, serología (dot blot, ELISA), hibridación molecular y técnicas híbridas, como ISEM (serología asociada a microscopía electrónica) (Lorenz *et al.*, 1995; Gundersen y Lee, 1996; Green *et al.*, 1999; Waterwork y Mock, 1999); sin embargo, estos métodos poseen una sensibilidad limitada, no son prácticos para trabajar un gran número de muestras y algunos de ellos no permiten realizar la identificación del fitoplasma encontrado. En la actualidad, la principal técnica usada para detectar e identificar fitoplasmas en plantas es la PCR, asociada al análisis del polimorfismo del largo de los fragmentos de restricción (RFLP) (Gundersen y Lee, 1996; Green *et al.*, 1999; Waterwork y Mock, 1999). Con PCR se amplifican zonas del gen *16S rRNA* a través de parejas de partidores específicos, utilizados en PCR anidada, para aumentar la sensibilidad de la detección de fitoplasmas (Ahrens y Seemüller, 1992; Gundersen y Lee, 1996; Laviña y Batlle, 1997).

Identificación y clasificación

Los primeros intentos para diferenciar a los fitoplasmas se basaron en el conocimiento de sus propiedades biológicas como son la sintomatología, rango de hospedantes y la especificidad de la transmisión por los insectos vectores. Debido al desarrollo de la biología molecular el ARN ribosomal ha adquirido una gran importancia en el estudio de la evolución de las bacterias. Específicamente, los genes ribosomales 16S y 23S poseen regiones altamente conservadas, por lo que se utilizan como marcadores moleculares en estudios de filogenia. Sin embargo, hoy en día para fines prácticos de diagnóstico, los fitoplasmas comúnmente se clasifican basándose en patrones de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) del fragmento de 1,2 kpb del gen *16S rRNA* (Lee *et al.*, 1998). Debido a la disponibilidad de nuevas tecnologías (por ejemplo el “deep sequencing”) es posible contar con un mayor número de secuencias completas o casi completas del genoma de diferentes especies de fitoplasmas, por lo tanto el análisis de la secuencia del *16S rRNA* puede ser eficazmente complementado utilizando otras regiones genómicas, obteniendo una más clara separación taxonómica a nivel intraespecífico. Es el caso del gen *tuf* que codifica para el

factor de elongación, la región intergénica 16S-23S rRNA; del gen *secY* que codifica para la subunidad de una translocasa y del gen que codifica para la proteína ribosomal (rp) (Bertaccini, 2007; Lee *et al.*, 2009).

En la actualidad las secuencias depositadas en el NCBI (National Center for Biotechnology Information's) y el análisis de RFLPs *in silico*, ha permitido reconocer 37 especies como '*Candidatus Phytoplasma*' ('Ca. P. '), en su mayoría basados en al menos el 97,5% de identidad de la secuencia del gen *16S rRNA*, características biológicas, y otros marcadores moleculares exclusivos de cada 'Ca. P. '

Transmisión de fitoplasmas

Los fitoplasmas, como parásitos obligados, deben vivir en el hospedero, por lo tanto, la transmisión de estos patógenos puede ocurrir a través de insectos vectores, propagación de material vegetal infectado (injerto, estacas y micropropagación), pero no por transmisión mecánica.

La transmisión por insectos vectores, envuelve diferentes niveles de relaciones de especificidad de hospedero-patógeno y probablemente es una interacción altamente específica, ya que para que la transmisión ocurra, estos fitopatógenos deben penetrar el intestino y las barreras de las glándulas salivales del insecto. No todos los vectores son capaces de transmitir todos los tipos de fitoplasmas, debido a la complejidad de eventos durante el proceso de transmisión y la especificidad entre la proteína inmunodominante de la membrana fitoplasmática (IDP) y la presencia de receptores en las células del tracto intestinal u otro órgano del insecto vector. Dichas proteínas han sido estrictamente relacionadas con uno o varios fitoplasmas, lo cual sugiere que existe un alto grado de especificidad pero divergente según las características de los grupos (Kakizawa *et al.*, 2006). Dicha situación puede explicar, en parte, que numerosos fitoplasmas tienen una baja especificidad por el vector, por lo que pueden ser transmitidos por diferentes especies de insectos. Por ejemplo; fitoplasmas del grupo 16SrI ("Aster yellows") son transmitidos por a lo menos 24 especies de cicadélidos (Christensen *et al.*, 2005). En la naturaleza, los fitoplasmas se transmiten mayormente a través de insectos que se alimentan del floema, pertenecientes a las familias Cicadellidae, Cixiidae, Delphacidae, Derbidae, Flatidae y Psyllidae, con la modalidad persistente propagativa.

La transmisión de fitoplasmas a través de propagación de material vegetal puede ser a través de rizomas, bulbos y tubérculos, como ocurre con la papa, cuyos tubérculos recién cosechados no presentan síntomas característicos de fitoplasmas e incluso después del periodo de almacenamiento (estado de latencia). Pero al momento de la brotación el patógeno se reproduce gracias a la síntesis y movimiento de nutrientes al iniciarse la formación de los brotes en el tubérculo (Leyva *et al.*, 2002). Otro mecanismo de transmisión es por conexión vascular producida entre plantas infectadas y no infectadas por plantas parasíticas tales como *Cuscuta* spp.

Como todas las enfermedades infecciosas los fitoplasmas también son transmitidos por injertación. Su eficiencia de transmisión está condicionada por la distribución irregular de los fitoplasmas en las plantas. En la naturaleza, la facultad de cualquier planta para hospedar uno o más fitoplasmas, depende no solo de la susceptibilidad a la infección, sino también del resultado de la interacción vector-fitoplasma-planta (Sugio *et al.*, 2011).

Medidas de control

Hoy en día, el control de las enfermedades fitoplásmicas se basan exclusivamente en la prevención de la infección. Es estratégico el uso de material vegetal de propagación resistente o libre de fitoplasmas. Además es importante controlar a los insectos vectores (Chiesa *et al.*, 2007). Por otro lado la introducción de genes de resistencia a enfermedades a través de la reproducción tradicional de las especies vegetales es muy lenta y ha sido difícil identificar los genes de resistencia en las plantas de un cultivo o en las de sus parentales. Los recientes avances en la producción de plantas genéticamente modificadas a través de vectores de genes de transferencia, permiten la aceleración de estos procesos de reproducción. La introducción de genes foráneos o la regulación de los genes internos en estas plantas transgénicas, podrían dar lugar a la alteración de la expresión genética que puede interferir con el crecimiento de fitoplasmas y/o modificar la respuesta del hospedero a las infecciones fitoplásmicas. Como resultado, los síntomas de la enfermedad pueden ser atenuados. La expresión de anticuerpos de ingeniería en plantas ha mostrado cierta eficiencia en el control de una enfermedad fitoplásmica (Loi *et al.*, 2002).

Distribución de fitoplasmas en el mundo

En los últimos años, se han reportado numerosas enfermedades, cuyas etiologías hasta entonces eran desconocidas; sin embargo, actuales diagnósticos han demostrado que son causadas por fitoplasmas.

La distribución geográfica de algunos fitoplasmas parece estar relacionada con la presencia de las plantas hospederas y los insectos vectores, los cuales tienen un rol muy importante en la epidemiología de las enfermedades. Por ejemplo, los fitoplasmas pertenecientes a los grupos ribosomales *Ash yellows* (16SrVII), *Clover proliferation* (16SrVI) y algunos *X-disease* (16SrIII), parecen estar distribuidos en la parte occidental del Continente Americano. Por otro lado, los fitoplasmas del grupo *Peanut witches' broom* (16SrII) y *Rice yellow dwarf* (16SrXI), se limitan a la región del Sudeste Asiático. Por otro lado, el grupo *Apple proliferation* (16SrX) y subgrupo *Stolbur* (16SrXII-A), se confinan al continente Europeo (Bisognin *et al.*, 2008). Otro agrupamiento geográfico es representado por el fitoplasma *Maize bushy stunt* [16SrI-B (rp-L)], que se limita a América Central, Sudamérica y parte de Norteamérica; estas regiones corresponden con el área de distribución geográfica de los insectos vectores *Dalbulus maidis* y *D. elimatus* (Costanzo, 2012).

Se tiene que considerar que la particularidad de la vegetación y de las especies de insectos en los micro y macro ecosistemas de cada continente pueden cambiar debido a la falta de conservación de germoplasma, o por medio de la introducción de germoplasma foráneo (por ejemplo maleza y cultivos) y/o insectos. Así, el fitoplasma asociado a un hospedero vegetal original puede dispersarse y ser redistribuido en todas las regiones geográficas. Por eso los fitoplasmas se han extendido mucho más allá de las regiones donde se originaron, especialmente si en los nuevos nichos ecológicos existen hospederos e insectos vectores. Algunos fitoplasmas (por ejemplo, *Aster yellows*, subgrupo ribosomal 16SrI-B) han llegado a dispersarse por todo el mundo, mientras que otros han quedado aislados en nuevos nichos ecológicos y han evolucionado de forma independiente a partir de cepas parentales (Lee *et al.*, 2003). La distribución varía de acuerdo al grupo o tipo de fitoplasma, ya que muchos parecen estar restringidos a un continente o a una región geográfica específica.

Importancia de las enfermedades causadas por fitoplasmas en las pomáceas

Las enfermedades causadas por este tipo de patógenos muestran en los últimos años un aumento en la incidencia y representan una amenaza para el futuro, siendo incluso factores limitantes para la producción en numerosos cultivos, causando grandes pérdidas económicas que van desde una reducción parcial en el rendimiento y calidad de la cosecha, hasta la pérdida casi total de cientos de cultivos alrededor del mundo. La proliferación de manzano (*Apple proliferation* - AP) está presente en casi todos los países europeos. Esta enfermedad reduce el calibre de los frutos (aproximadamente el 50%), el peso (63% - 74%) y la calidad organoléptica de la fruta. Recientemente se demostró que existe variabilidad genética en la especie '*Candidatus Phytoplasma mali*' y que cada aislado es responsable de la intensidad de la sintomatología observada en manzanos y demás especies de *Malus* ornamentales y de avellano (*Corylus* spp.). Se han identificado dos especies de psílidos responsables de la diseminación del fitoplasma en los huertos de manzano: *Cacopsylla picta* (Förster), en el noreste de Italia y en Alemania; *Cacopsylla melanoneura* (Förster), presente solo en el noroeste de Italia. Adicionalmente, se ha demostrado que en Alemania el cicadélido *Fieberiella florii* (Stal, 1864), ocasionalmente puede transmitir el '*Candidatus Phytoplasma mali*' (Bertaccini, *et al.*, 2014).

El decaimiento del peral (*Pear decline* - PD) fue reportado por primera vez en 1945 en las regiones occidentales de América del Norte. En California, entre el 1959 y el 1962, murieron por esta enfermedad 1.100.000 árboles. Por otro lado, en Italia se registró la muerte de 50.000 árboles (Batiste & Bulla, 1980); mientras que en Alemania, a principios de los 70, se registró un 27,8% de muertes en plantaciones de 8 años (Nemeth, 1986). En América del Norte y en el Reino Unido el vector conocido es *Cacopsylla pyricola* (Förster), mientras que *Cacopsylla pyri* L. se ha encontrado como vector principal en los países europeos. Los estudios han indicado que el '*Candidatus Phytoplasma pyri*' es capaz de invernar en los tejidos de *C. pyri* y se replica durante la etapa vegetativa de crecimiento de los árboles. Mientras que la edad del árbol y la variedad no parecen influir en la aparición de la enfermedad, se han reportado diferencias en la susceptibilidad de variedades y portainjertos. En Chile no hay información respecto a estas enfermedades.

Situación de enfermedades causadas por fitoplasmas en Chile

La primera referencia de enfermedades asociadas a la presencia de fitoplasmas en Chile es del año 1945 (Hepp y Sandoval, 1997) cuando, en parcelas experimentales, se observó la presencia de síntomas de “marchitez de la remolacha”. Trabajos posteriores, realizados en la vid en Chile, permitieron la identificación molecular de “Aster yellows” (subgrupos 16SrI-B y 16SrI-C), “Stolbur” (subgrupo 16SrXII-A), el cual está asociado con la enfermedad denominada “bois noir” y de los subgrupos 16SrVII-A, 16SrV-A y 16SrIII-J (Fiore *et al.*, 2007; Gajardo *et al.*, 2009; González *et al.*, 2010; Fiore *et al.*, 2015). Recientemente, se ha señalado la presencia de '*Ca. Phytoplasma fraxini*' (16SrVII-A) en flores de peonía (*Paeonia lactiflora* Pall.), '*Ca. Phytoplasma ulmi*' (16SrV-A) en plantas de murtilla (*Ugni molinae* Turcz.) y chaura (*Gaultheria phillyreifolia* (Pers.) Sleumer), del subgrupo ribosomal 16SrIII-J en cerezo (Arismendi *et al.*, 2010; Arismendi *et al.*, 2011a; 2011b; González *et al.*, 2011; Rebolledo *et al.*, 2015).

Así mismo se ha determinado que *Convolvulus arvensis* L., una maleza de ciclo perenne, presenta los fitoplasmas de los subgrupos 16SrI-B, 16SrVII-A y 16SrXII-A;

mientras que a su vez *Polygonum aviculare* L. de tipo anual, presenta los del subgrupo 16SrI-B y 16SrVII-A. En *Galega officinalis* L., maleza también de tipo perenne, se encontraron los fitoplasma 16SrVII-A y 16SrIII-J. En base a estos antecedentes, los autores concluyeron que dichas malezas actúan como reservorio natural de la enfermedad, pues comparten los mismos subgrupos de fitoplasmas con el cultivo de la vid (Fiore *et al.*, 2007; Longone *et al.*, 2011; Fiore *et al.*, 2014). La presencia de estos patógenos en las plantas depende tanto de la propagación de plantas infectadas y transmisión por especies de insectos tales como *Paratanus exitiosus* (Beamer) y *Bergallia valdiviana* Berg 1881, que transmiten el fitoplasma 16SrIII-J (X-disease group) (Longone *et al.*, 2011; Quiroga *et al.*, 2014).

En resumen, la evidencia reportada a la fecha indica que los fitoplasmas pertenecientes a los subgrupos ribosomales 16SrIII-J y 16SrVII-A, son los más frecuentes en Chile, afectando vid, cerezo, murtila, chaura, peonías y varias especies de malezas (Gajardo *et al.*, 2009; Arismendi *et al.*, 2010; Arismendi *et al.*, 2011b).

BIBLIOGRAFIA

- Ahrens, U. and E. Seemüller. 1992. Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology* 82:828-832.
- Álvarez, M.; B. Pinilla y G. Herrera. 2004. Enfermedades del manzano. Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Centro Regional de Investigación La Platina Colección de libros INIA N°10, Santiago, Chile. 71p.
- Arismendi, N.; N. Andrade; R. Riegel and R. Carrillo. 2010. Presence of a phytoplasma associated to “witches’ broom” disease in *Ugni molinae* Turcz. And *Gaultheria phillyreifolia* (Pers.) Sleumer determined by DAPI, PCR and DNA sequencing. *Chilean Journal of Agricultural Research* 70: 26-33.
- Arismendi, N.; N. Andrade; R. Riegel; A. Zamorano and N. Fiore. 2011a. Molecular identification of 16SrIII-J and 16SrV-A phytoplasmas in *Ugni molinae* and *Amplicephalus curtulus*. Pp 11-12. In: XX Congreso Sociedad Chilena de Fitopatología. Santiago, Chile 29-30 Noviembre, 01 Diciembre, 2011. Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. Santiago, Chile.
- Arismendi, N.; F. González; A. Zamorano; A. Andrade; A.M. Pino and N. Fiore 2011b. Molecular identification of ‘*Candidatus* Phytoplasma fraxini’ in murta and peony in Chile. *Bulletin of Insectology* 64: 95-96.
- ASVID. 2009. Fruticultura-Doc 3 sectores emergentes en fruticultura. Sector Fruticultura. Informe para el Consejo Nacional de Innovación para la Competitividad. Preparado para CNIC. Chile. 66 pp.
- Batiste, W.C. and A.D. Bulla. 1980. Establishment, spread and current distribution of pear psylla in Western Colorado. Colorado State University Experiment Station Progress Report 11, Fort Collins, Co, 3 pp.
- Bertaccini, A. 2007. Phytoplasmas: diversity, taxonomy and epidemiology. *Frontiers in Bioscience* 12: 673-689.
- Bertaccini, A.; B. Duduk; S. Paltrinieri and N. Contaldo. 2014. Phytoplasmas and phytoplasma diseases: A severe threat to agriculture. *American Journal of Plant Sciences* 5: 1763-1788.
- Bisognin, C.; B. Schneider; H. Salm; M.S. Grando; W. Jarausch; E. Moll and E. Seemüller. 2008. Apple proliferation resistance in apomictic rootstocks and its relationship to phytoplasma concentration and simple sequence repeat genotypes. *Phytopathology* 98: 153-158.
- Chiesa, S.; S. Prati; G. Assante; D. Maffi and P.A. Bianco. 2007. Activity of synthetic and natural compounds for phytoplasma control. *Bulletin of Insectology* 60: 313-314.
- Christensen, N.M.; K.B. Axelsen; M. Nicolaisen and A. Schulz. 2005. Phytoplasmas and their interactions with hosts. *TRENDS in Plant Science* 10: 526-535.

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

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

Davis, R. and W.A. Sinclair. 1998. Phytoplasma identity and disease etiology. *Phytopathology* 88: 1372-1376.

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

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

Fiore, N.; V. Longone; F. González; A. Zamorano; A.M. Pino; J. Araya; L. Picciau; A. Alma; S. Paltrinieri; N. Contaldo and A. Bertaccini. 2012. Transmission of 16SrIII-J Phytoplasma by *Paratanus exitiosus* Leafhopper. Proceedings of the 17th Congress of ICVG, Davis, California, USA October 7-14, 2012.

Fiore, N.; A. Zamorano; X. González, N. Quiroga. y A.M. Pino. 2014. Detección del fitoplasma 16SrIII-J en *Galega officinalis* L. Resumen XXIII Congreso SOCHIFIT, Talca, 3-5 diciembre 2014, p. 15.

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

Fiore, N.; A. Zamorano and A.M. Pino. 2015. Identification of phytoplasmas belonging to the ribosomal groups 16SrIII and 16SrV in Chilean grapevines. *Phytopathogenic Mollicutes*, 5(1): 32-36.

Gajardo, A.; N. Fiore; S. Prodan; S. Paltrinieri; S. Botti; A.M. Pino; A. Zamorano; J. Montealegre and A. Bertaccini. 2009. Phytoplasmas associated with grapevine yellows disease in Chile. *Plant Disease* 93: 789-796.

González, F.; A. Zamorano; A.M. Pino. y N. Fiore. 2010. Caracterización molecular de nuevos fitoplasmas en la vid en Chile. Resumen XIX Congreso SOCHIFIT, Pucón, Chile, 9-12 noviembre 2010, p 103.

González, F.; A. Zamorano; A.M. Pino and N. Fiore. 2011. Identification of phytoplasma belonging to X-disease group in cherry in Chile. *Bulletin of Insectology*: S235-S236, 2011.

Green, M.J.; D.A. Thomsom and D.J. Mackenzi. 1999. Easy and efficient DNA extraction from woody plants for the detection of phytoplasmas by polymerase chain reaction. *Plant Disease*. 83(5): 482-485.

- Gundersen, D.E. and Y.M. Lee. 1996. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primers pairs. *Phytopathol. Mediterr.* 35: 144-151.
- Hepp, R. y C. Sandoval. 1997. Estudios en marchitez amarilla de la remolacha (*Beta vulgaris*L. var. *saccharifera*). *AgroCiencia*, 13: 253-256.
- Jakovljevic, V.; P. Otten; C. Berwarth; A. Krähler and W.Jelkmann. 2015. Search for the causal agent of apple rubbery wood disease: RNA-seq and wood structure analysis. 23rd International Council for the Study of Virus and other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops (ICVF) Meeting. 7-12 June , Morioka, Japan.
- Kakizawa, S.; K. Oshima and S. Namba. 2006. Diversity and functional importance of phytoplasma membrane proteins. *TRENDS in Microbiology* 14:254-256.
- Latorre, B.; M.Rioja and C. Lillo. 2002a. Effects of temperature on infection and a warning system for pear blossom blast caused by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Crop Protection* 21:33-39.
- Latorre, B.; S. Viertel; M. Rioja. y C. Lillo. 2002b. Susceptibilidad de la flor y efecto de la temperatura sobre el desarrollo del tizón bacteriano del peral. *Fitopatología* 37:81.
- Laviña, A. y A. Batlle. 1997. Identificación de fitoplasmas de la viña en diferentes áreas vinícolas de España. *Técnicas de Identificación. Viticultura Profesional* 52: 32-36.
- Lee, I.; R. Davis. y D. Gundersen. 2000. Phytoplasma: Phylogenic Mollicutes. *Annual Review of Microbiology* 54: 221-255.
- Lee, I.M.; D.Gundersen and A. Bertaccini. 1998. Phytoplasma: Ecology and genomic diversity. *Phytopathology* 88: 1359-1366.
- Lee, I.M.; M. Martini, K., Bottner; R. Dane; M .Black and N. Troxclair. 2003. Ecological implications from a molecular analysis of phytoplasmas involved in an aster yellows epidemic in various crops in Texas. *Phytopathology* 93, 1368-1377.
- Lee, I.M.; Y. Zhao and R.E. Davis. 2009. Prospects of multiple gene-based systems for differentiation and classification of phytoplasmas. Chapter: 4 Pp 51. In: *Phytoplasmas: 58 Genomes, Plant Hosts and Vectors*. Edited by Weintraub, P. G., Gilat Research Center, Israel and Jones, P., Rothamsted Research, UK 336 p.
- Leyva, N.E.; J.C. Ochoa; D.S. Leal, D.S. and P. Martinez. 2002. Multiple Phytoplasmas associated whit potato diseases in Mexico. *Can. J. Microbiol.* 48: 1062-1068.
- Loi, N.; P. Ermacora; L. Carraro; R. Osler and T.A. Chen. 2002. Production of monoclonal antibodies against apple proliferation phytoplasma and their use in serological detection. *European Journal of Plant Pathology* 108:81-86.

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

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

Méndez, P.; N. Quiroga; A.M. Pino; A. Zamorano y N. Fiore. 2015. Virus y viroides presentes en manzano (*Malus domestica* Bork) en Chile. XXIV Congreso de la Sociedad Chilena de Fitopatología, 1-3 de Diciembre, Viña del Mar, Chile.

Montealegre, J.; J. Henríquez; R. Herrera y M. Arias. 2006. Nuevos antecedentes sobre hongos asociados a pudriciones de manzanas en pre y postcosecha. *Simiente (Chile)* 76(3-4):27.

Nemeth, M., 1986. Virus, Mycoplasma and Rickettsia diseases of fruit trees. Martinus Nijhoff and W. Junk ed. Budapest. 841pp.

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

Pinilla, B. 2009. Pudriciones de postcosecha de manzanas y peras. Conferencia. p. 121-124. In: Libro de Resúmenes. XV Congreso Latinoamericano y XVIII Congreso Chileno de Fitopatología. 12-16 Enero de 2009. Santiago, Chile.

Pūpola, N.;I. Moročko-Bičevska; A.Kāleand A. Zeltis. 2011. Ocurrence and diversity of pome fruit viruses in apple and pear orchard in Latvia. *Journal of Phytopatology* 159:597-605.

Quiroga, N.; X. González; A. Zamorano;A.M. Pino; L. Picciau; A. Alma; S Paltrinieri; N. Contaldo; A. Bertaccini y N. Fiore. 2014. Transmisión del fitoplasma 16SrIII-J a través del cicadélido *Bergallia valdiviana* Berg 1881. Resumen XXIII Congreso SOCHIFIT, Talca, 3-5 diciembre 2014, p. 16.

Rebolledo, C.; R. Facundo; N. Quiroga; A Zamorano. y N. Fiore. 2015. Detección y caracterización molecular de fitoplasmas asociados a frutales de carozo en Chile. XXIV Congreso de la Sociedad Chilena de Fitopatología, 1-3 de Diciembre, Viña del Mar, Chile.

Ribeiro, L.F.C.; I.P. Bedendo and R.M.V. Sanhueza. 2007. Evidência molecular da ocorrência de um fitoplasma associado ao lenho mole da macieira. *Summa Phytopathologica*, v 33, n.1, p.30-33.

Schneider, H. 1962. Bud union anatomy of pear (*Pyrus*) decline trees. *Phytopathology* 52, 751.

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. *International Journal of Systematic Bacteriology* 54:1217- 1226.

Sugio, A.; A.M. MacLean; H.N. Kingdom; V.M. Grieve; R. Manimekalai and S.A. Hogenhout. 2011. Diverse targets of phytoplasma effectors: from plant development to defense against insects. *Annual Review of Phytopathology* 49:175-95.

Stal, C. 1864. Hemiptera nonnulla nova vel minus cognita. *Annales de la SocieteEntomologique de France* 4: 47-68.

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

Woese, C.R.; J. Maniloff.and L.B. Zablen. 1980. Phylogenetic analysis of the mycoplasmas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77: 494-498.

CAPÍTULO II

PROSPECCIÓN DE FITOPLASMAS EN CULTIVOS DE MANZANO Y PERAL EN CHILE

RESUMEN

En Chile, durante los períodos otoño-primavera del 2014 y verano-otoño del 2015, se colectaron 125 muestras de manzano y 67 de peral, con y sin síntomas de fitoplasmas, en las regiones Metropolitana, Bernardo O'Higgins, Maule, Bío Bío y Araucanía. Todas las muestras se analizaron para la detección de fitoplasmas, utilizando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa anidada (PCR-anidada) orientada a los genes *tuf* y *16S rRNA*. De cinco muestras de peral con síntomas se obtuvieron los productos de amplificación esperados para los dos genes. Las secuencias nucleotídicas de los productos de amplificación del gen *16S rRNA*, de cuatro muestras presentaron el 100% de identidad con aislados de '*Candidatus Phytoplasma pyri*' provenientes de Europa y Canadá y una muestra presentó el 99,9% y 99,8% de identidad con los aislados 'Sugar beet yellow wilt phytoplasma' y 'Chayote witches broom phytoplasma' provenientes de Chile y Brasil respectivamente. El análisis de RFLP *in silico* confirmó la identificación. Adicionalmente, los análisis moleculares y bioinformáticos del gen *tuf* permitieron determinar e identificar la presencia del fitoplasma del subgrupo ribosomal 16SrIII-J en dos muestras de peral y en una muestra de manzano. En otra muestra de peral se encontró un fitoplasma perteneciente al subgrupo ribosomal 16SrX-C. Además, en otras dos muestras de manzano, el fitoplasma detectado se pudo caracterizar solo a nivel de grupo ribosomal en cuanto al RFLP *in silico* genera perfiles que difieren de los demás subgrupos conocidos, pertenecientes al grupo 16SrIII. Estos últimos resultados sugieren la presencia de un nuevo subgrupo ribosomal. El presente trabajo representa la primera detección de fitoplasmas en pomáceas en Chile y corresponde a la primera detección, en Sudamérica, del fitoplasma perteneciente al subgrupo ribosomal 16SrX-C, agente causal de la enfermedad conocida como *Pear decline*, una de las enfermedades más severas que afectan al peral en el mundo.

Palabras claves: nested-PCR, clonamiento, secuenciación, 'Ca. P.'

ABSTRACT

In Chile, during autumn and spring of 2014 and summer-autumn of 2015, 125 samples of apple and 67 samples of pear were collected, considering plants with and without symptoms of phytoplasma infection, in the Metropolitan, Bernardo O'Higgins, Maule, Biobio and Araucania regions. All samples were analyzed for the detection of phytoplasma, using the technique of nested polymerase chain reaction (nested-PCR) for amplification of *tuf* and *16Sr RNA* genes. Five pear samples that presented symptoms associated to phytoplasma infection, were successfully amplified, obtaining the expected PCR products for both genes. After sequencing of *16S rRNA*, amplicons four samples showed 100% of nucleotide identity with isolates of '*Candidatus Phytoplasma pyri*' from Europe and Canada and one samples presented 99.9% and 99.8% nucleotide identity with the isolates ' Sugar beet yellow wilt phytoplasma' and 'Chayote witches broom phytoplasma' from Chile and Brazil respectively. RFLP Analysis *in silico* confirmed the identification. Furthermore, molecular and bioinformatic analyses of the *tuf* gene allowed to determine and identify the presence of phytoplasma ribosomal subgroup 16SrIII-J in two samples of pear and one sample of apple. In other one sample of pear was found a phytoplasma belonging to ribosomal subgroup 16SrX-C. In addition, in other two samples of apple with successful amplification and sequencing of *tuf* gene, phytoplasmas detected were only characterized at the ribosomal group level, because the *in silico* RFLP profiles differ from other known isolates that belong to the Group 16SrIII. These results suggest the presence of a new ribosomal subgroup. This work represents the first detection of phytoplasmas in pome fruit trees in Chile and also describes the first detection in South America of phytoplasma belonging to ribosomal subgroup 16SrX-C, the causal agent of 'Pear decline', one of the most devastating diseases of pear around the world.

Keywords: nested-PCR, cloning, sequencing, '*Candidatus Phytoplasma*'

INTRODUCCIÓN

En Chile, el manzano (*Malus domestica* Borkh) y el peral (*Pyrus communis* L.) son especies importantes tanto por su superficie plantada (36,206 hectáreas de manzano y 8,537 de peral), como por el alto valor de la producción (ODEPA 2015). La producción es destinada principalmente a la exportación, representando una de las principales fuentes de divisas para el país. Para competir con otros países exportadores es necesario mantener altos rendimientos y buena calidad. Algunos de los factores limitantes en la producción de manzanas y peras son los agentes patógenos tanto nemátodos, hongos, bacterias, virus, viroides como fitoplasmas, que causan el aumento del costo de producción y disminuyen la productividad, calidad y vida útil de las plantas.

Entre las enfermedades infecciosas que afectan a las pomáceas, los fitoplasmas han tomado importancia en el mundo, debido a que no existen herramientas de control adecuadas en el campo y su manejo se basa sólo en la prevención de los eventos infecciosos. La enfermedad más importante causada por fitoplasmas en el manzano es la “proliferación del manzano” causada por (*Candidatus Phytoplasma mali*) y en el peral es el “declinamiento del peral” causada por (*Candidatus Phytoplasma pyri*).

Los fitoplasmas son procariotas pertenecientes a las clases Mollicutes, carentes de pared celular, característica que les confiere plasticidad, pleomorfismo y resistencia a compuestos antibacterianos que actúan inhibiendo la síntesis de la pared celular (Yu *et al.*, 1998). La plasticidad es una condición que los favorece para pasar de una célula floemática a otra con la ayuda de los fluidos vasculares (Lee *et al.*, 2000; Christensen *et al.*, 2005; Hogenhout *et al.*, 2008) prescindiendo de la presencia de flagelos. Son bacterias fitopatógenas, responsables de numerosas enfermedades conocidas como “amarilleces”. Las enfermedades causadas por este tipo de patógenos muestran, en los últimos años, un aumento en la incidencia y una amenaza para el futuro, siendo incluso factores limitantes para la producción en numerosos cultivos (McCoy *et al.*, 1989).

En Chile, se han identificado infecciones causadas por fitoplasmas en plantas nativas como murtilla (*Ugni molinae* Turcz.), chaura [*Gaultheria phillyreifolia* (Pers.) Sleumer] y en cultivos de importancia económica, como vid (*Vitis vinifera* L.), cerezo (*Prunus avium* L.), peonia (*Paeonia lactiflora* Pall) (Arismendi *et al.*, 2010; González *et al.*, 2011; Fiore *et al.*, 2012).

Actualmente, en Chile no hay estudios acerca de fitoplasmas que infectan a manzanos y perales, con la excepción de una supuesta infección por fitoplasmas en plantas de manzano con síntomas de “rubbery wood” (Hepp *et al.*, 1998). En dicho trabajo no se ha comprobado el origen fitoplásmico del producto de amplificación obtenido a través de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Además, otros autores ponen en duda la asociación entre “rubbery wood” y fitoplasmas (Poggi-Pollini *et al.*, 1995; Jakovljevic *et al.*, 2015).

En base a estos antecedentes, se propone la siguiente hipótesis:

HIPOTESIS

Los fitoplasmas presentes en el manzano y el peral en Chile, son diferentes a los que afectan estos cultivos en el mundo.

OBJETIVOS

Objetivo general

Prospectar los fitoplasmas presentes en manzano y peral en Chile.

Objetivo Específico

Detectar e identificar molecularmente los fitoplasmas presentes en plantas de manzano y peral en las principales regiones productivas de Chile.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta de material vegetal

Se realizó una prospección en huertos comerciales de manzano y peral de las regiones Metropolitana, Libertador Bernardo O'Higgins, del Maule, del Bío Bío y de la Araucanía. Se consideró 1 muestra cada 250 hectáreas, colectando principalmente ramillas de plantas con síntomas. Cuando no se encontraron plantas sintomáticas, la muestra fue tomada al azar

Los muestreos de las dos especies frutales se efectuaron durante el otoño y primavera 2014, verano y otoño del 2015. Durante cada recolección, cada muestra se mantuvo individualizada en bolsas de polietileno, que inmediatamente se sellaron y se colocaron en un "cooler" con hielo. Una vez en el laboratorio las bolsas se transfirieron a un refrigerador a 6-8°C.

Registro de síntomas

En cada muestra colectada se registró la presencia y/o ausencia de síntomas asociados con enfermedades provocadas por fitoplasmas como cambios de color en el follaje (amarillamientos y enrojecimientos), excesiva proliferación de brotes, defoliación anticipada, malformación de hojas, menor vigor, hojas con estípulas grandes, necrosis del floema, crecimiento reducido, hojas anormalmente pequeñas y acucharadas, con pérdida de color verde o con coloraciones diferentes. Una vez concluido el proceso de caracterización sintomatológica, se tomaron fotografías de las partes dañadas de cada planta, y se identificó el número de hilera, número de planta y las coordenadas geográficas con un GPS.

Extracción del DNA

Los ácidos nucleicos totales se extrajeron a partir de 1g de nervaduras principales de hojas, a través del método fenol-cloroformo (Prince *et al.*, 1993). El cual se describe a continuación:

En un mortero estéril, se colocó 1 g de tejido y se molió con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. Posteriormente, se adicionó 8 mL de grinding buffer (100 mM de K_2HPO_4 , 30 mM de KH_2PO_4 , 10% de sacarosa, 2% de PVP, 0,15 % de BSA fracción V y 30 mM de ácido ascórbico) y se transfirió a un tubo de 15 mL. El macerado se centrifugó por 30 minutos a 11.000 rev. a 4°C y el sobrenadante se eliminó. Al precipitado se le agregó 4 mL de buffer de extracción (0,1 M de Tris - HCl 1M pH 8,0, 50 mM de EDTA 0,5 M pH 8,0 y 0,5 M de NaCl), 100 mL de proteinasa K (5 mg/mL) y 440 µL de N lauryl-saucosil al 10 %, mezclándose por inversión. Luego los tubos se incubaron a 55°C por 60 minutos, terminada la incubación se centrifugó por 15 minutos a 7.500 g a 4°C. El sobrenadante se transfirió a un tubo que contenía 2,5 mL de isopropanol (0,6 v/v) y se dejó incubar a -20°C por 30 minutos. Luego se centrifugó por 15 minutos a 7.500 g a 4°C y se eliminó el sobrenadante. El precipitado se resuspendió con 3 mL de buffer TE 1X (10 mM de Tris - HCl 1 M pH 8,0 y 1 mM de EDTA 0,5 M pH 8,0), 50 µL de RNasas y 75 µL de SDS al 20 % y se mezcló por inversión e incubó a 37°C por 1 hora. Tras la incubación, se añadió 525 µl de NaCl 5 M y 420 µl de CTAB/NaCl (CTAB al 10% y 0,7 M de NaCl), nuevamente se mezcló e incubó a 65°C por 10 minutos. Una vez concluida la incubación, se agregó 2 mL de cloroformo: alcohol isoamílico 24:1 y 2 mL de fenol saturado en TE 1X pH 8,0 se agitó vigorosamente y se

centrifugó por 10 minutos a 6.500 g a 4°C. La fase superior se transfirió a un tubo con 2,5 mL isopropanol (0,6 v/v), se mezcló por inversión y se dejó a 4°C toda la noche. Al día siguiente, se centrifugó por 30 minutos a 11.000 g a 4°C y se descartó el sobrenadante con cuidado. El precipitado de ADN fue lavado con 1 mL de etanol frío al 70%. Posteriormente, se centrifugó por 10 minutos a 11.000 g a 4°C y se eliminó el sobrenadante. Los tubos se dejaron secar hasta evaporarse todo el alcohol etílico. Finalmente, el ADN se resuspendió en 50 a 200 µL de buffer TE 1X pH 8,0 y se traspasó a tubos de 0,6 ml, guardándose las muestras a 4°C. Posteriormente el ADN se cuantificó con un espectrofotómetro UV.

Detección de fitoplasmas por PCR anidada

Para la detección de los fitoplasmas se utilizó la técnica denominada “nested”- PCR (PCR anidada), que consistió en un primer PCR con partidores universales, cuyo producto de amplificación se sometió a un segundo PCR con otra pareja de partidores universales, para aumentar la sensibilidad de la técnica (Gundersen y Lee, 1996). Los partidores utilizados en este estudio amplificaron regiones del genoma del fitoplasma correspondientes a dos genes.

Gen tuf

Las PCR para la amplificación del gen *tuf* se realizaron según el protocolo de Makarova *et al.* (2012). Para la detección de los fitoplasmas, se utilizó en el PCR directo, una mezcla de partidores Tuf340/Tuf890 que amplifica 550 pb. La dilución 1:20 del producto de amplificación del PCR anterior se utilizó en el nested-PCR, realizado con otra mezcla de partidores Tuf400/Tuf835 que amplifican 420-440 pb (Tabla 1). Cada PCR se realizó utilizando un volumen final de 30 µL que contenía los siguientes componentes: 2,5 µL de ADN extraído (20 ng/µL), 1 µL de cada partidador según corresponda (10 µM), 3 µL de buffer PCR (10X), 1 µL de MgCl₂ (25 mM), 0,6 µL de dNTP's (10 mM), 21 µL de agua bidestilada y 0,2 µL de enzima Taq polimerasa Platinum (Invitrogen). Posteriormente estas reacciones se llevaron a un termociclador (Techne TC 3000 6) con incubación de 3 minutos a 94°C, seguido de 35 ciclos que consistió en las siguientes etapas: desnaturalización de 15 segundos a 94°C; apareamiento de partidores por 30 segundos a 54°C; elongación de 1 minuto a 72°C. La extensión final fue de 72°C durante 7 minutos seguida por una reducción de la temperatura a 4°C por un tiempo indefinido para enfriamiento y conservación de las moléculas de ADN sintetizadas. En ambas reacciones de PCR se utilizó el mismo procedimiento.

Tabla 1. Partidores que se utilizaron para la detección del gen *tuf* propuestos por Makarova *et al.* (2012).

Partidores	Secuencia (5' - 3')
Tuf340	Tuf340a GCTCCTGAAGAAARAGAACGTGG
	Tuf340b ACTAAAGAAGAAAAAGAACGTGG
Tuf890	Tuf890ra ACTTGDCCTCTTTCKACTCTACCAGT
	Tuf890rb ATTTGTCCTCTTTWCACACGTCCTGT
	Tuf890rc ACCATTCTCTTTCAACACGTCCAGT
Tuf400	Tuf400a GTAAAACGACGGCCAGTGAAACAGAAAAACGTCAYTATGCTCA
	Tuf400b GTAAAACGACGGCCAGTGAAACTTCTAAAAGACATTACGCTCA
Tuf400	Tuf400c GTAAAACGACGGCCAGTGAAACATCAAAAAGACAYTATGCTCA
	Tuf400d GTAAAACGACGGCCAGTGAAACAGAAAAAAGACAYTATGCTCA
	Tuf400e GTAAAACGACGGCCAGTCAAACAGCTAAAAGACATTATYCTCA
Tuf835	Tuf835ra TAATACGACTCACTATAGGGAACATCTTCWACHGGCATTAAAGAAAGG
	Tuf835rb TAATACGACTCACTATAGGGAACACCTTCAATAGGCATTAAAAAWGG
Tuf835	Tuf835rc TAATACGACTCACTATAGGGAACATCTTCTATAGGTAATAAAAAAGG

Gen 16S rRNA

La amplificación del gen *16S rRNA* se realizó a través de PCR (Deng y Hiruki, 1991; Schaff *et al.*, 1992; Gundersen y Lee, 1996; Smart *et al.*, 1996). Para la detección de fitoplasmas, se utilizaron en el PCR directo los partidores universales P1/P7 que amplifican 1.810 pb. Luego, se realizó un primer nested-PCR, previa dilución de 1:20 del producto de amplificación del PCR anterior; para ello se usaron los partidores R16mF2 y R16mR1 que amplifican 1.430 pb, finalmente se realizó un segundo nested-PCR, previa dilución de 1:20 del producto del primer nested-PCR usando los partidores R16F2n/R2 que amplifican 1.250 pb (Tabla 2).

Tabla 2. Partidores universales para la detección del gen *16S rRNA*.

Partidores	Secuencia (5' - 3')	Cita bibliográfica
P1	AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT	Deng y Hiruki, 1991
P7	CGTCCTTCATCGGCTCTT	Smart <i>et al.</i> , 1996
R16mF2	CATGCAAGTCGAACGGA	Davis <i>et al</i> 2003
R16mR1	CTTAACCCCAATCACGAC	Davis <i>et al</i> 2003
R16F2n	GAAACGACTGCTAAGACTGG	Gundersen y Lee, 1996
R16R2	TGACGGGCGGTGTGTACAAACCCCG	Gundersen y Lee, 1996

Cada reacción de PCR se realizó con un volumen final de 30 μ L que contenía los siguientes componentes: 2 μ L de ADN extraído (20 ng/ μ L), 0,6 μ L de cada partidor según corresponda (nmol/ μ L), 3 μ L de buffer PCR (10X), 1,5 μ L de MgCl₂ (50 μ M), 1 μ L de dNTP's (10 μ M), 22 μ L de agua bidestilada y 0,2 μ L de enzima Taq polimerasa Platinum (Invitrogen). Estas reacciones se llevaron a cabo en un termociclador (Techne TC 3000 6) con incubación de 1 minuto a 94°C, seguido de 35 ciclos que consistió en las siguientes etapas: desnaturalización de 1 minuto a 94°C; apareamiento de los partidores por 45 segundos a 53°C (55°C desde el segundo ciclo); elongación de 90

segundos a 72°C. La extensión final fue de 72°C durante 7 minutos seguida por una reducción de la temperatura a 4°C por un tiempo indefinido para enfriamiento y conservación de las moléculas de ADN sintetizadas. Para la reacción del nested-PCR se utilizó el mismo procedimiento que la primera reacción, solo modificando la temperatura de apareamiento de los partidores, utilizando 55°C.

Electroforesis

Los productos de amplificación procedentes de los nested-PCR para ambos genes estudiados, se analizaron a través de electroforesis, en gel de agarosa 1,2% utilizando buffer TAE 1X (Tris 40 mM, 20 mM de ácido acético y EDTA 1 mM, pH 8,0). La electroforesis se realizó utilizando una fuente de poder (EPS-300 IIV) a 120 voltios durante 23 minutos. Los productos de amplificación se visualizaron a través de un transiluminador de luz UV y se fotografió utilizando el equipo de fotodocumentación de luz UV. Para la determinación del tamaño de los fragmentos amplificados se utilizó 7 µL de ADN ladder 100 bps (Invitrogen). Las bandas de ADN positivas amplificadas en los nested-PCR se cortaron del gel de agarosa y se purificaron siguiendo el protocolo comercial E.Z.N.A Kit (Omega Biotek).

Clonamiento

Ligación de los productos de PCR en el vector de clonación

Solo los fragmentos de 1.250 pb de fitoplasmas amplificados por nested-PCR y posteriormente purificados, fueron ligados en el vector de clonación pGEM-T Easy Vector System I (Promega). La reacción de ligación fue realizada de la siguiente manera: se mezclaron 3 µL de ADN purificado, 1 µL del vector (25ng/ µL), 5 µL de buffer de clonación (2X) y 1 µL de T4 DNA ligasa (3U/ µL), en un volumen total de reacción de 10 µL. Posteriormente, la reacción se incubó a 4°C durante toda la noche. Después de este proceso, el producto de la ligación estuvo listo para ser transferido a las células competentes de la bacteria *Escherichia coli*.

Transformación de las células competentes

Posteriormente se realizó el proceso de transformación, a través del cual el vector que contenía el fragmento de ADN se insertó en las células competentes de *E. coli* Top 10® (Invitrogen). En un microtubo de 1,5 mL se colocaron 10 µL de la reacción de ligación y 100 µL de células competentes; todo se mantuvo en hielo por 10 minutos. Luego se procedió al choque térmico, por incubación a 42°C por 2 minutos. Se volvieron a colocar los microtubos en hielo por 2 minutos. Luego, se agregaron 400 µL de medio líquido de LB (1% de triptona, 0,5 % de extracto de levadura, 0,25 % de NaCl) a los microtubos que contenían las células transformadas. Los microtubos se incubaron a 37°C por 1 hora en agitación para promover el crecimiento de las células transformadas. Posteriormente, se centrifugaron los microtubos a 3.000 rpm por 2 minutos para obtener un concentrado de células y se descartó aproximadamente 450 µL del sobrenadante. Luego, se resuspendió el “pellet” en el resto del sobrenadante (aproximadamente 50 µL). Bajo campana de flujo laminar, se sembraron 20 µL de la reacción de transformación en placas Petri con medio LB 4% de agar, carbenicilina (100 mg/mL), IPTG (100 mg/mL) (isopropinil-β-Dtiogalactopiranosida) y X-Gal (20 ng/mL) (5-bromo-4-cloro-3indol-β-D galactopiranisida) y se incubaron por 16 horas a 37°C. Al final del periodo de incubación fue posible diferenciar entre las células transformadas de aquellas no transformadas, a través de la coloración que presentan las colonias. Las

células transformadas presentaban colonias de color blanco. Esto sucede cuando las colonias recombinantes han incorporado el plasmidio con el fragmento de ADN: la inserción interrumpe el marco de lectura de la β -galactosidasa haciéndola no funcional. Por lo tanto es incapaz de emplear el sustrato XGal para producir la coloración azul que aparece en las colonias formadas a partir de una célula transformada con un plasmidio que no llevaba inserto un fragmento en el marco de lectura de la β -galactosidasa. Finalmente, se realizó un PCR con los partidores específicos SP6 y T7, que amplifican la zona de inserción del fragmento clonado. Posteriormente se purificó el resultado de este PCR a partir del gel de agarosa para secuenciación.

Obtención de secuencias

Una vez purificado el ADN de los genes *tuf* y *16S rRNA*, de las muestras positivas se enviaron a MacroGen Corp (USA) para su secuenciación.

Identificación molecular y análisis bioinformático

Las secuencias se alinearon utilizando los programas BioEdit and CLUSTAL X2 (Thompson *et al.*, 1997; Hall, 1999); el análisis filogenético se realizó utilizando el método de “Minimum Evolution” de MEGA, versión 64.0 (Tamura *et al.*, 2007), las secuencias nucleotídicas obtenidas se compararon con aquellas de fitoplasmas publicadas en el National Center for Biotechnology Information (NCBI) disponible en internet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). Para completar la identificación se realizó el análisis del polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) *in silico* (virtual) (Zhao *et al.*, 2009).

RESULTADOS

Toma de muestras

Durante el estudio (otoño y primavera del 2014, verano y otoño del 2015), de 28 huertos comerciales y 1 vivero, se colectaron 125 muestras de manzano y solo en 14 huertos se encontraron plantas con síntomas que podrían haber sido causados por fitoplasmas. Así mismo, de 18 huertos comerciales y 1 vivero, se colectaron 67 muestras de peral y solo en 11 huertos se encontraron plantas con síntomas (Tabla 3).

Los árboles de los cuales se tomaron muestras mostraban cambios o modificaciones sustanciales de los patrones de crecimiento normal. Los síntomas característicos de cada especie se resumen en la Tabla 4.

Tabla 3. Distribución de muestras colectadas por región.

Región	Cultivo	Muestras sin síntomas	Muestras con síntomas	Total de muestras
Metropolitana	Manzano	4	0	4
	Peral	0	0	0
O'Higgins	Manzano	38	7	45
	Peral	31	9	40
El Maule	Manzano	52	14	66
	Peral	6	16	22
Bío Bío	Manzano	0	0	0
	Peral	0	5	5
Araucanía	Manzano	3	7	10
	Peral	0	0	0
Total de muestras		134	58	192

Las muestras que presentaron síntomas fueron colectadas principalmente en otoño y primavera (Figura 1).

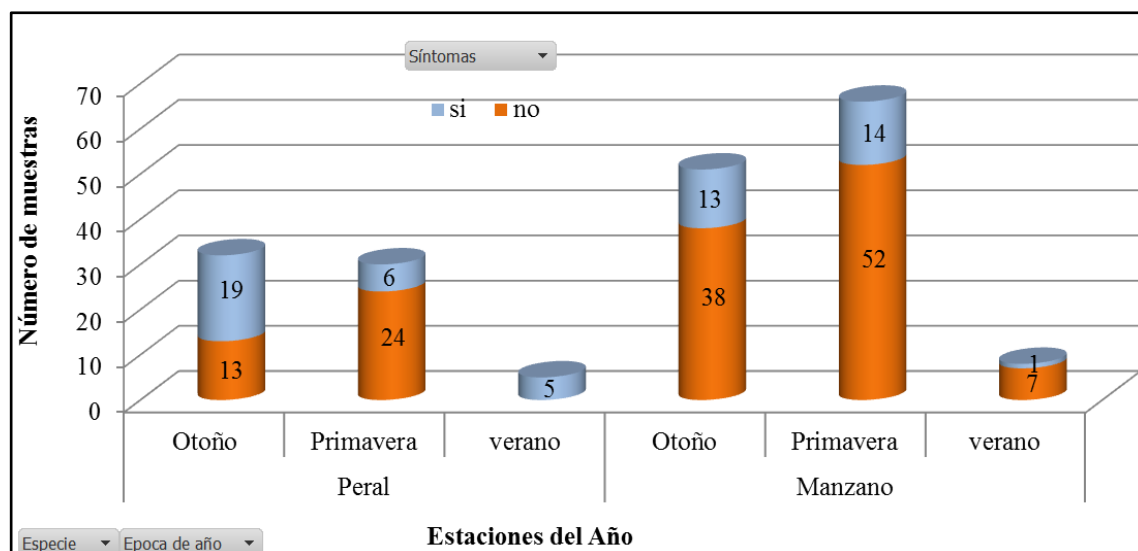


Figura 1. Número de muestras tomadas en verano, otoño y primavera. Las porciones en celeste corresponden a las plantas con presencia de síntomas. Las porciones anaranjadas, representan a las plantas asintomáticas.

Síntomas de las plantas de manzano y peral positivas a fitoplasmas

Los árboles de manzano con síntomas presentaron excesivo crecimiento de brotes, estípulas más grandes, clorosis marginal en las hojas, arrosetamiento de brotes, hojas con epinastia, hojas acucharadas con consistencia de papel (Figura 2).

Los síntomas en peral variaron según el período de muestreo: en primavera-verano se observaron hojas pequeñas acucharadas, con manchas necróticas en el borde de la hoja, o completamente de color verde claro, brotes arrosetados y escaso vigor (Figura 3); en otoño los síntomas fueron enrojecimiento generalizado de las hojas, escaso vigor, defoliación anticipada, necrosis del floema, brazos muertos, epinastia en las hojas y frutos deformados (Figuras 4 y 5).

Tabla 4. Síntomas observados en manzano y peral.

Síntomas	Peral	Manzano
Enrojecimiento generalizado del follaje	x	
Amarillez de hojas	x	x
Brotes arrosetados		x
Epinastia de hojas	x	x
Clorosis marginal en las hojas		x
Hojas acucharadas y deformes	x	x
Muerte de ramas	x	
Excesivo crecimiento de brotes		x
Defoliación prematura	x	
Escaso vigor	x	
Hojas pequeñas	x	x
Necrosis del floema	x	
Prevalencia de plantas sintomáticas	30/67 (44,8%)	28/125 (22,4%)



Figura 2. Síntomas en plantas de manzano. Izquierda proliferación de brotes en la variedad Fuji; derecha: hojas pequeñas y acucharadas en la variedad Royal Gala.



Figura 3. Síntomas observados en peral. Izquierda: hojas pequeñas y amarillas en la variedad Bosc; derecha: brazo muerto y hojas pequeñas.



Figura 4. Síntomas observados en peral: Izquierda enrojecimiento generalizado en la variedad D'Anjou; derecha: reducción de crecimiento en la variedad Williams.



Figura 5. Síntomas observados en peral variedad Williams. Izquierda: necrosis del floema; derecha: enrojecimiento de hojas.

Detección de fitoplasmas por nested-PCR

Mediante el estudio del gen *tuf*, 11 muestras resultaron positivas, de las cuales tres fueron de manzano (Pom176, Pom262 y Pom275) y ocho de peral (Pom78, Pom136, Pom138, Pom242, Pom243, Pom265, Pom266 y Pom282) (Figura 6 y Tabla 7 en apéndice).

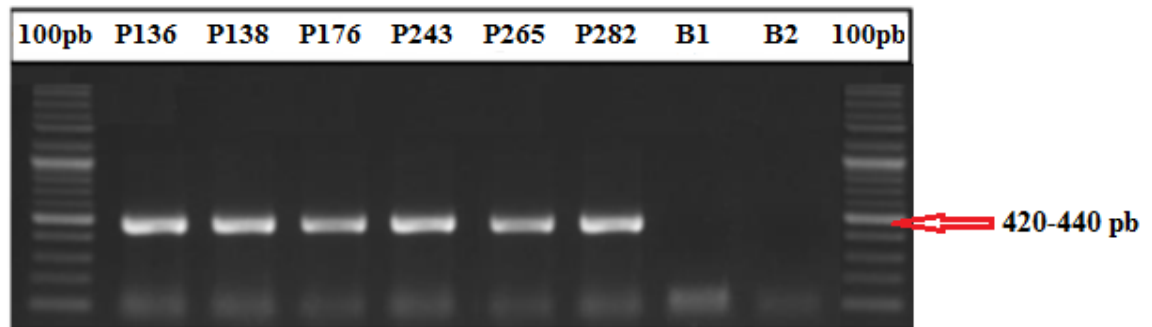


Figura 6. Amplificación a través de Nested PCR con los partidores *tuf*400/*tuf*835 (gen *tuf*) de plantas de manzano (Pom176) y de peral (Pom136, Pom138, Pom243, Pom265 y Pom282); 100pb: marcador de peso molecular; B1: control negativo de PCR directo; B2: control negativo de nested PCR.

Posteriormente, para la amplificación del gen *16S rRNA* por nested PCR con los partidores descritos, se amplificó un fragmento de 1.250 pb en cinco muestras de peral (Pom136, Pom138, Pom243, Pom265 y Pom266) (Figura 7 y Tabla 7 en apéndice).

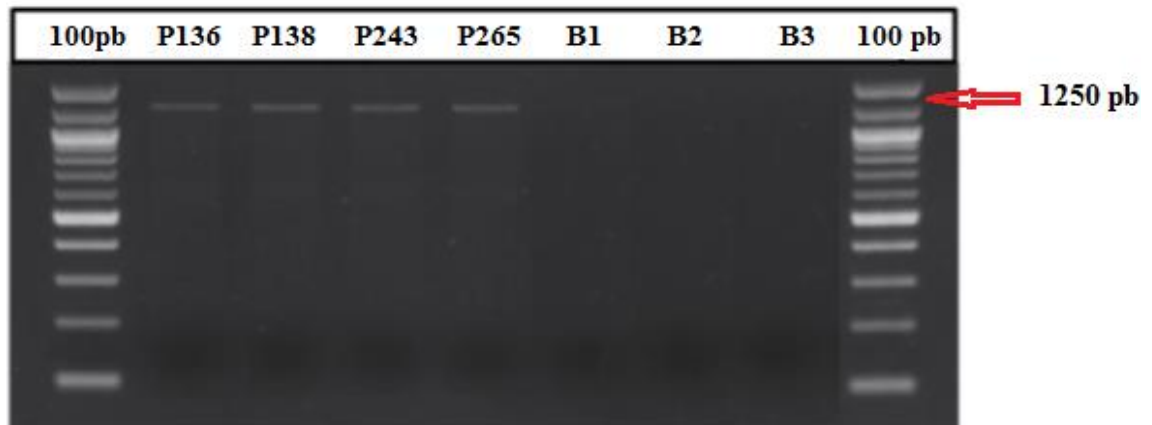


Figura 7. Amplificación a través de Nested PCR con los partidores R16F2n/R2 (gen *16S rRNA*) de plantas de peral (Pom136, Pom138, Pom243 y Pom265); 100pb: marcador de peso molecular; B1: control negativo de PCR directo; B2: control negativo del primer nested PCR; B3: control negativo del segundo nested PCR.

Identificación de fitoplasmas por análisis de secuencia y RFLP *in silico*

Gen tuf

Los productos de amplificación de *Tuf*400/*Tuf*835 (420 a 444 pb) de los fitoplasmas detectados en manzano y peral, se secuenciaron directamente. Las secuencias nucleotídicas de las muestras chilenas se alinearon y se compararon con las referencias que se encuentran en la base de datos publicadas en “GenBank” (NCBI) (Tabla 5).

Dado que los porcentajes de identidad nucleotídica de las secuencias de las muestras del grupo ribosomal 16SrIII varió entre 95% y 100% se analizó el porcentaje de cada muestra por separado para dicho análisis se usó las mismas referencias publicadas en el GenBank.

Las muestras de peral Pom78, Pom138 y Pom282 tienen el 100% de identidad nucleotídica con el aislado chileno Hort72, referencia del fitoplasma 16SrIII-J; mientras que las muestras Pom136, Pom242, Pom243, Pom 265 y Pom 266 presentaron el 100% de identidad nucleotídica con los aislados de '*Candidatus Phytoplasma pyri*' (subgrupo ribosomal 16SrX-C) procedente de Alemania. Para las muestras obtenidas de manzano, Pom176, Pom262 y Pom275, se alcanzó un máximo de 97,6%, 98,2% y 99,7% de identidad nucleotídica con el aislado chileno Hort72, respectivamente.

El análisis de las secuencias de los productos de amplificaciones por nested-PCR del gen *tuf*, indica que las muestras de pomáceas son fitoplasmas pertenecientes al grupo ribosomal 16SrIII, para las muestras de manzano y a los grupos 16SrIII y 16SrX para las muestras obtenidas de peral.

Tabla 5. Comparación de los porcentajes de identidad nucleotídica del gen *tuf* entre las muestras chilenas y las referencias disponibles en GenBank.

Especie	Aislado	Origen	Subgrupo ribosomal	N° de genBank	% de Identidad										
					Pom78	Pom136	Pom138	Pom176	Pom242	Pom243	Pom262	Pom265	Pom266	Pom275	Pom282
Peach X-disease phytoplasma	"CX"	Canadá	16SrIII-A	JQ824211	96,4%	71,3%	96,4%	95,9%	71,3%	71,3%	96,4%	71,3%	71,0%	96,1%	96,4%
Crepis biennis' yellows phytoplasma	"CR"	Italia	16SrIII-B	JQ824258	96,4%	71,6%	96,4%	96,1%	71,6%	71,6%	96,6%	71,6%	71,3%	96,1%	96,4%
Goldenrod yellows phytoplasma	"GR1"	Usa	16SrIII-D	JQ824232	96,6%	71,0%	96,6%	95,9%	71,0%	71,0%	96,4%	71,0%	70,8%	96,4%	96,6%
Spirea stunt phytoplasma	"SP1"	Usa	16Sr III-E	JQ824281	95,6%	70,8%	95,6%	94,8%	70,8%	70,8%	95,3%	70,8%	70,5%	95,3%	95,6%
Milkweed yellows phytoplasma	"MW1"	Usa	16Sr III-F	JQ824206	95,9%	71,8%	95,9%	95,6%	71,8%	71,8%	96,1%	71,8%	71,6%	95,6%	95,9%
Poinsettia phytoplasma	"PoiLilo"	Dinamarca	16Sr III-H	JQ824286	96,4%	71,3%	96,4%	95,9%	71,3%	71,3%	96,4%	71,3%	71,0%	96,1%	96,4%
Sugar beet yellow wilt disease phytoplasma	"Hort72"	Chile	16SrIII-J	KM658259	100,0%	71,8%	100,0%	97,6%	71,8%	71,8%	98,2%	71,8%	71,6%	99,7%	100,0%
Candidatus Phytoplasma mali	"AP-15"	Italia	16Sr X-A	JQ824216	72,3%	94,8%	72,3%	71,8%	94,8%	94,8%	71,8%	94,8%	94,5%	72,1%	72,3%
Plum leptonecrosis phytoplasma	"LNp"	Italia	16Sr X-B	JQ824235	71,0%	95,0%	71,0%	70,5%	95,0%	95,0%	70,5%	95,0%	94,8%	70,8%	71,0%
Candidatus Phytoplasma pyri	"PD"	Alemania	16Sr X-C	Q824247	71,8%	100,0%	71,8%	71,8%	100,0%	100,0%	71,8%	100,0%	100,0%	71,6%	71,8%

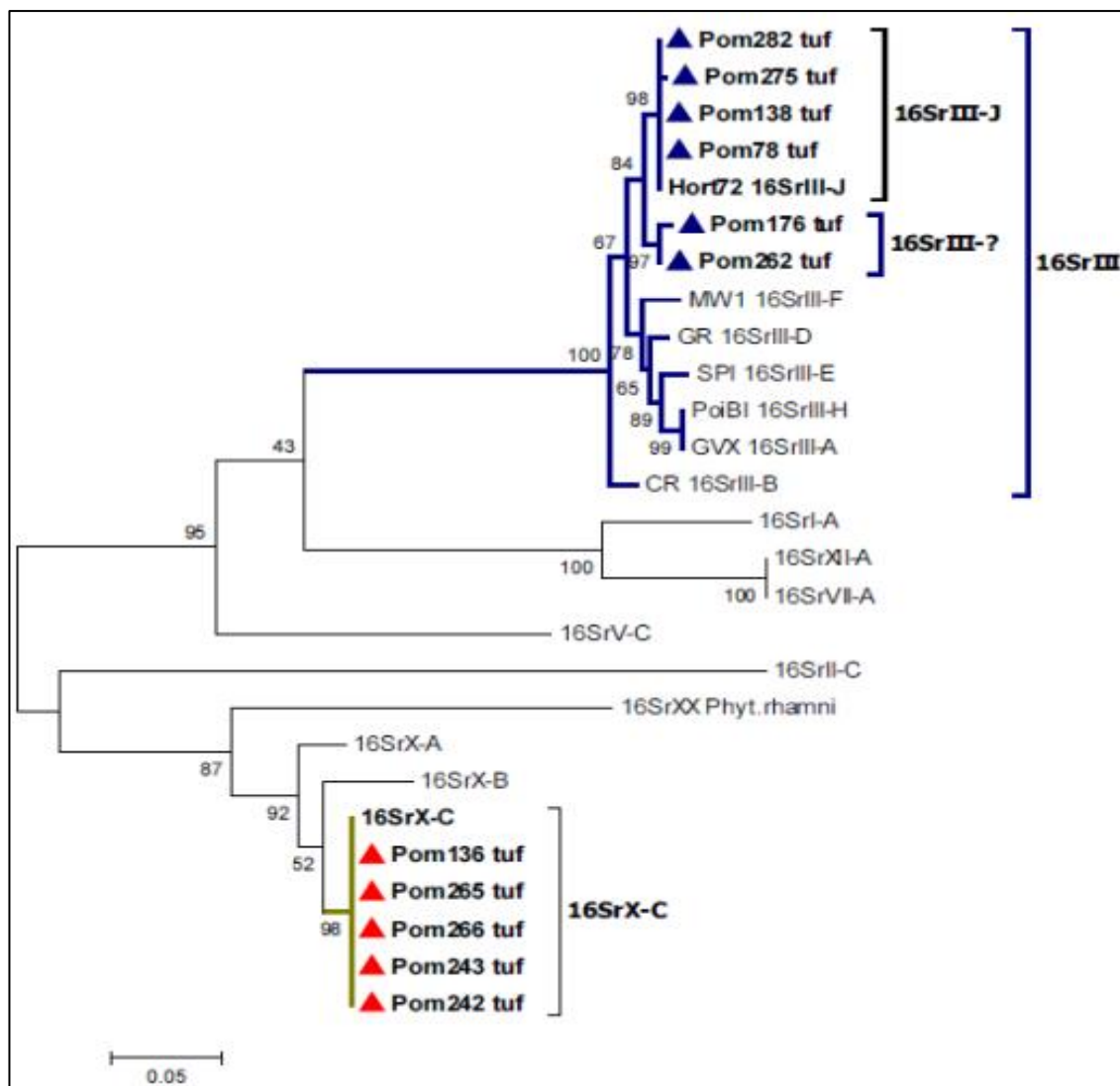


Figura 8. Árbol filogenético, basado en la comparación de secuencias nucleotídicas del gen *tuf* de fitoplasmas encontrados en las muestras de peral y manzano. La barra de escala representa una distancia genética relativa.

En el árbol filogenético (Figura 8) se puede observar que tres muestras de peral (Pom78, Pom138 y Pom282) y una muestra de manzano (Pom275) se asocian en un primer cluster con el aislado Chileno Hort72 perteneciente al subgrupo ribosomal 16SrIII-J, que se separa claramente del grupo en el cual se ubicaron las otras dos muestras encontradas en manzano (Pom176 y Pom262) con síntomas de “mosaico puntiforme, manchas cloróticas, hojas pequeñas y acucharadas, borde de las hojas con mancha necróticas, hojas deformes y proliferación de brotes” (Tabla 7 en Apéndice). Por otro lado se puede apreciar que las cinco muestras de peral (Pom136, Pom242, Pom243, Pom265 y Pom266) restantes se distancian de ambos grupos y se ubican junto al aislado '*Candidatus Phytoplasma pyri*', proveniente de Alemania.

Para confirmar el subgrupo ribosomal se realizó el análisis virtual de RFLP para el gen *tuf*, los perfiles generados de la digestión con la enzima *MseI*, de las muestras de peral Pom78, Pom138 y Pom282 y los de manzano Pom176 y Pom262 presentaron perfiles

idénticos a los aislados Sugar beet yellow wilt “Hort72” (16SrIII-J) y *Crepis biennis* phytoplasma “CR” (16SrIII-B) (Figura 9).

La muestra Pom275 al ser digerida por la enzima *MseI* muestra un perfil diferente respecto al aislado de referencia del subgrupo 16SrIII-J, al presentar un cambio nucleotídico que genera un punto de corte adicional. Posteriormente, se eligió una nueva enzima de corte frecuente para confirmar el subgrupo ribosomal de las muestras, ya que a pesar que el más alto porcentaje de identidad lo relacionaría con el aislado de referencia del subgrupo ribosomal 16SrIII-J, dichos porcentajes no son suficientemente altos como para considerar la pertenencia a este subgrupo y además porque presentan un perfil idéntico al aislado de referencia CR, perteneciente al subgrupo ribosomal 16SrIII-B.

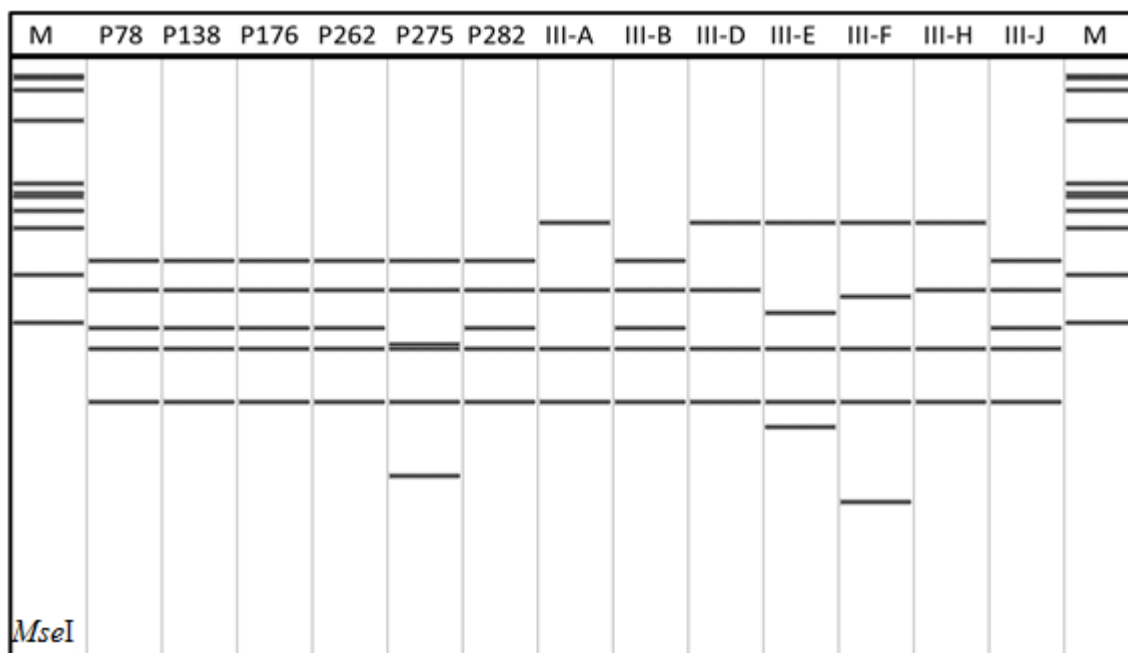


Figura 9. Análisis virtual en gel de poliacrilamida al 6% que muestra los perfiles de RFLP; obtenidos a partir de la digestión del gen *tuf*, con la enzima *MseI*, en muestras de manzano y peral. Secuencias de fitoplasma utilizadas como referencias: CX (16SrIII-A), CR (16SrIII-B), SP1 (16SrIII-E), MW1 (16SrIII-F), PoiLilo (16SrIII-H), Hort72 (16SrIII-J). Con las muestras: Pom78, Pom138, Pom282 (peral); Pom176, Pom262, Pom275 (manzano); M: marcador molecular.

Por lo tanto se utilizó la endonucleasa *NdeII* confirmándose que las muestras Pom78, Pom138 y Pom282 (peral) y Pom275 (manzano) pertenecen al subgrupo ribosomal 16SrIII-J. Sin embargo, las muestras Pom176 y Pom262 (manzano) presentaron perfiles diferentes, e idénticos a todos los subgrupos ribosomales disponibles en GenBank, con excepción del aislado de referencia de 16SrIII-J (Figura 10).

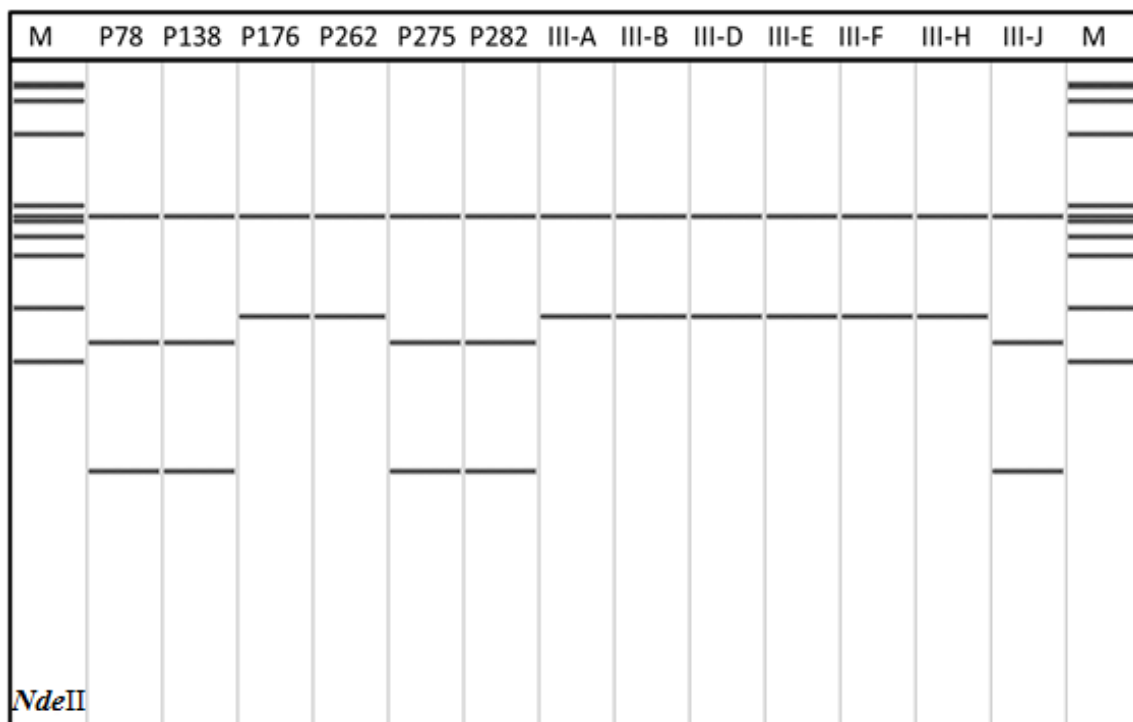


Figura 10. Análisis virtual en gel de poliacrilamida al 6% que muestra los perfiles de RFLP; obtenidos a partir de la digestión del gen *tuf*, con la enzima *NdeII*, en muestras de manzano y peral. Secuencias de fitoplasma utilizadas como referencias: CX (16SrIII-A), CR (16SrIII-B), GR1 (16SrIII-D), SP1 (16SrIII-E), MW1 (16SrIII-F), PoiLilo (16SrIII-H), Hort72 (16SrIII-J). Con las muestras: Pom78, Pom138, Pom282 (peral); Pom176, Pom262, Pom275 (manzano); M: marcador molecular.

Para poder asignar un subgrupo ribosomal a las muestras Pom176 y Pom262 (manzano), se utilizó la enzima *Tsp509I* (Figura 11). Sin embargo, el RFLP no permitió discriminar entre los subgrupos de referencia disponibles en GenBank, ya que las muestras de manzano mostraron perfiles diferentes a todos los publicados en dicha base de datos.

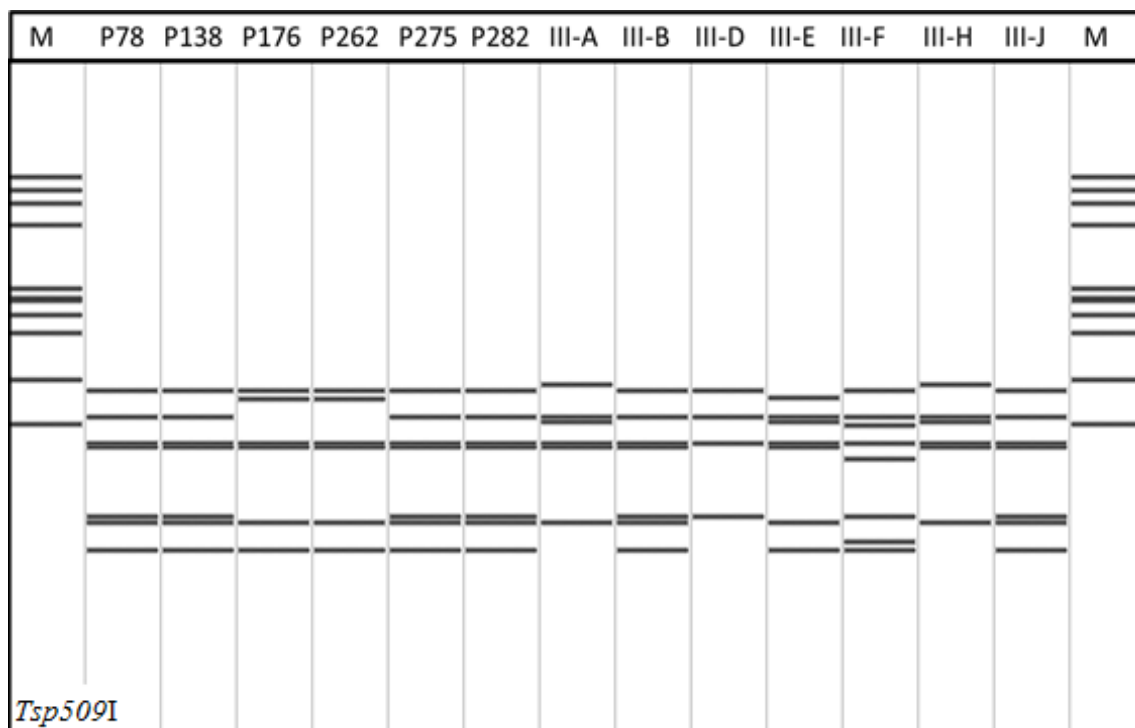


Figura 11. Análisis virtual en gel de poliacrilamida al 6% que muestra los perfiles de RFLP; obtenidos a partir de la digestión del gen *tuf*, con la enzima *Tsp509I*, en muestras de manzano y peral. Secuencias de fitoplasma utilizadas como referencias: CX (16SrIII-A), CR (16SrIII-B), GR1 (16SrIII-D), SP1 (16SrIII-E), MW1 (16SrIII-F), PoiLilo (16SrIII-H), Hort72 (16SrIII-J). Con las muestras: Pom78, Pom138, Pom282 (peral); Pom176, Pom262, Pom275 (manzano); M: marcador molecular.

De la misma manera fueron analizadas las muestras de peral (Pom136, Pom242, Pom243, Pom265 y Pom266) que en el árbol filogenético se asociaban con el aislado de referencia del subgrupo ribosomal 16SrX-C. Con el análisis de RFLP obtenido con la endonucleasa de restricción *MseI* (Figura 12) se determinó que los fitoplasmas encontrados en las muestras de peral pertenecen al subgrupo 16SrX-C (*Candidatus Phytoplasma pyri*).

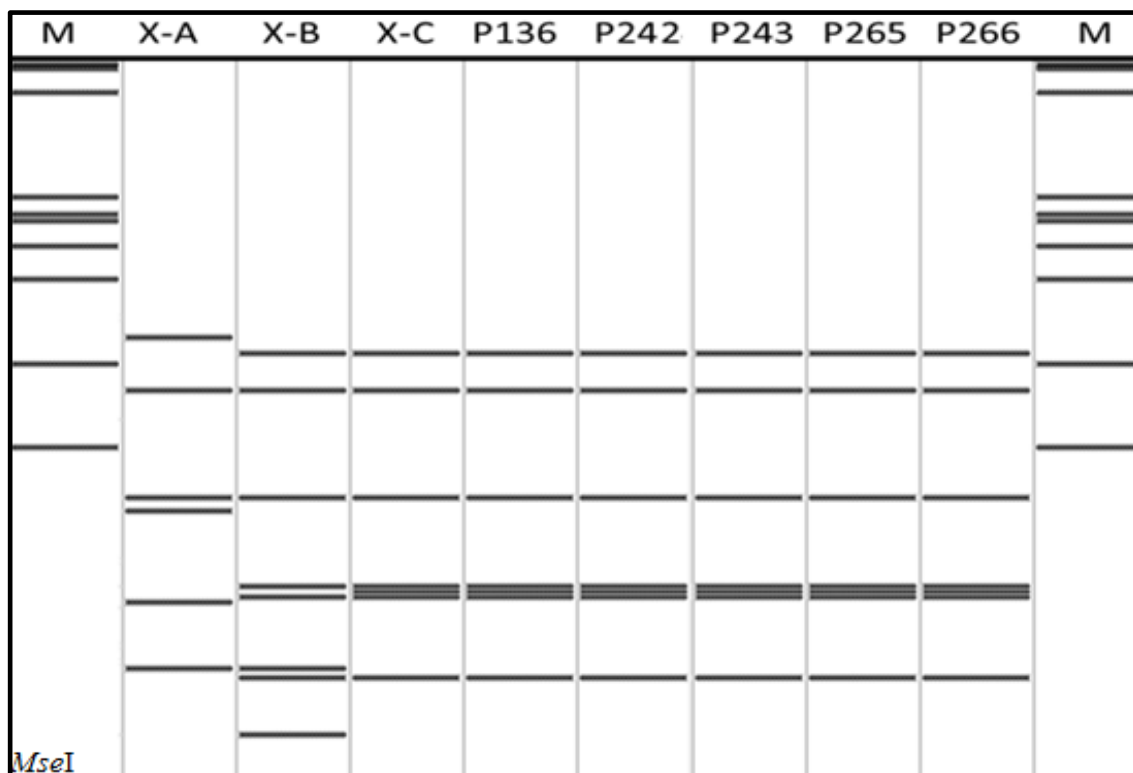


Figura 12. Análisis virtual en gel de poliacrilamida al 6% que muestra los perfiles de RFLP; obtenidos a partir de la digestión del gen *tuf*, con la enzima *MseI*, en muestras de peral. Secuencias de fitoplasma utilizadas como referencia: AP-15 (16SrX-A), LNP (16SrX-B), PD (16SrX-C). Con las muestras de peral: Pom136, Pom242, Pom243, Pom265, Pom266; M: marcador molecular.

Gen 16S rRNA

Los productos de amplificación de F2/R2 (1.250 pb) de los fitoplasmas detectados en peral, fueron clonados. Por cada muestra se rescataron cinco clones que se secuenciaron. Las secuencias obtenidas de cada clon referente a una misma muestra fueron idénticas entre sí (100% de similitud). La comparación de secuencia nucleotídica realizada en la base de datos del GenBank, indicó que cuatro muestras chilenas de peral (Pom136, Pom243, Pom265, Pom266) poseen un 100% de identidad nucleotídica con los aislados de referencia KF849463, KC902803, AJ54543 y JF796740 pertenecientes al subgrupo ribosomal 16SrX-C. Por otro lado, la muestra de peral Pom138 presentó el 99,8% y 99,9% de identidad respectivamente con los aislados de referencia AF147706 y KM658258, ambos pertenecientes al subgrupo ribosomal 16SrIII-J (Tabla 6).

En el caso de las muestras de peral Pom78, Pom282 y Pom242, como para las de manzano Pom176, Pom262 y Pom275, aún no se obtuvo los amplicones del gen *16S rRNA*.

Tabla 6. Fitoplasmas utilizados para la comparación de los porcentaje de similitud de secuencias nucleotídicas del gen *16S rRNA* entre las muestras de manzano y peral con los publicados en el GenBank.

Especie	Aislado	Origen	Hospedero	N° GenBank	% de Identidad				
					P136	P243	P265	P266	P138
' <i>Candidatus</i> Phytoplasma pyri'	"D764-08"	Eslovenia	Peral	KF849463	100	100	100	100	-
' <i>Candidatus</i> Phytoplasma pyri'	"PD25"	Irán	Peral	KC902803	100	100	100	100	-
' <i>Candidatus</i> Phytoplasma pyri'	"PD1"	Alemania	Peral	AJ54543	100	100	100	100	-
' <i>Candidatus</i> Phytoplasma pyri'	"357/2010"	Republica Checa	Peral	JF796740	100	100	100	100	-
Chayote witches' broom phytoplasma	"Ch10"	Brasil	Chayote	AF147706	-	-	-	-	99,8
Sugar beet yellow wilt phytoplasma	"Hort72"	Chile	Remolacha	KM658258	-	-	-	-	99,9

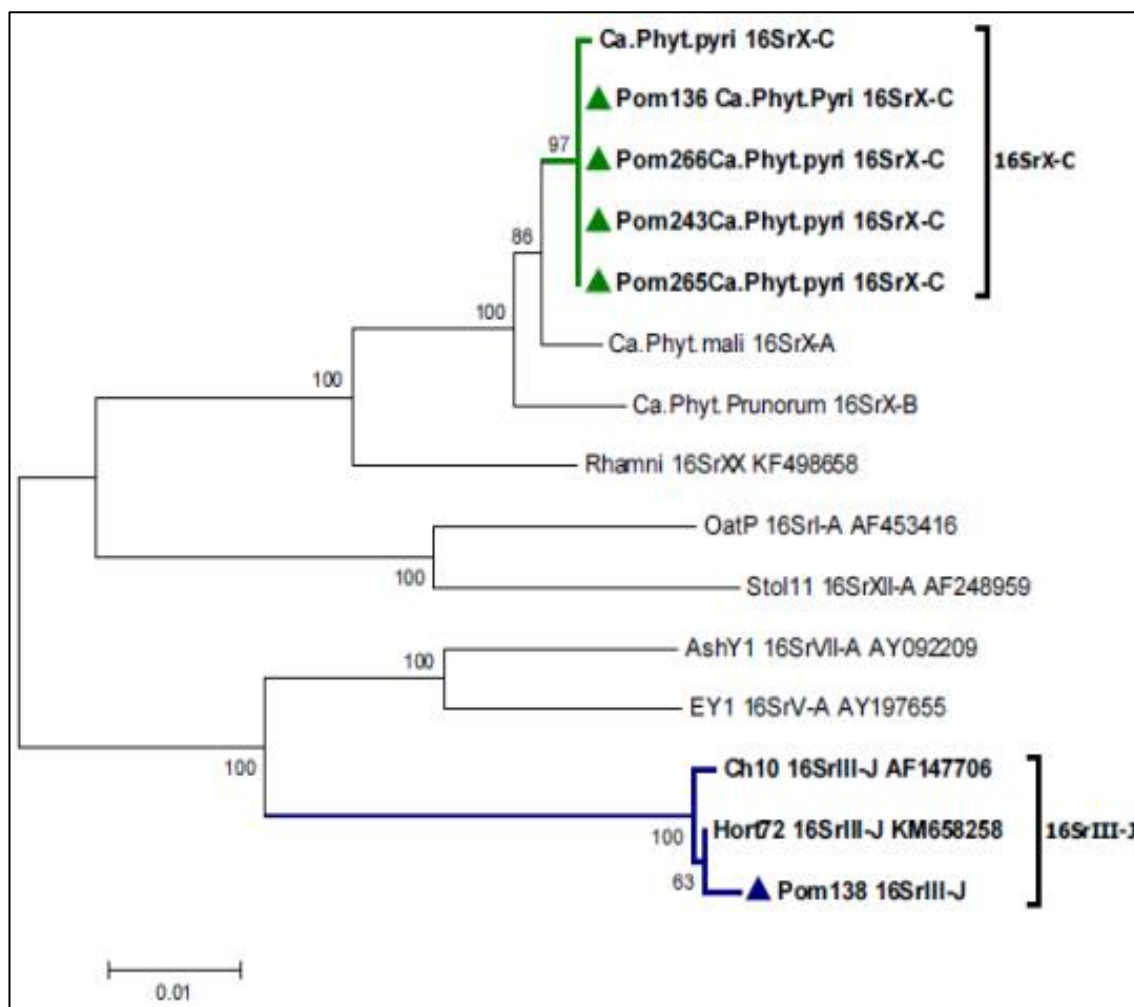


Figura 13. Árbol filogenético, basado en la comparación de secuencias nucleotídicas del gen *16S rRNA* de fitoplasmas encontrados en las muestras de peral. La barra de escala representa una distancia genética relativa.

Tanto en el árbol filogenético obtenido mediante el análisis del gen *tuf* como aquel obtenido del gen *16S rRNA* (Figura 13), se observó que las muestras Pom136, Pom243, Pom265 y Pom266 encontrados en peral, se agruparon con los aislados de Alemania 'Candidatus *Phytoplasma pyri*'. La muestra Pom138 (peral) se asoció con las referencias del subgrupo ribosomal 16SrIII-J.

Posteriormente, para confirmar la asignación del subgrupo ribosomal, se realizó la digestión virtual con la endonucleasa de restricción *MseI*, que indicó que los perfiles de digestión de las muestras Pom136, Pom243, Pom265 y Pom266 son idénticos a aquellos generados por los fitoplasmas de los subgrupos ribosomales de referencia 16SrX-A y 16SrX-C (Figura 14).

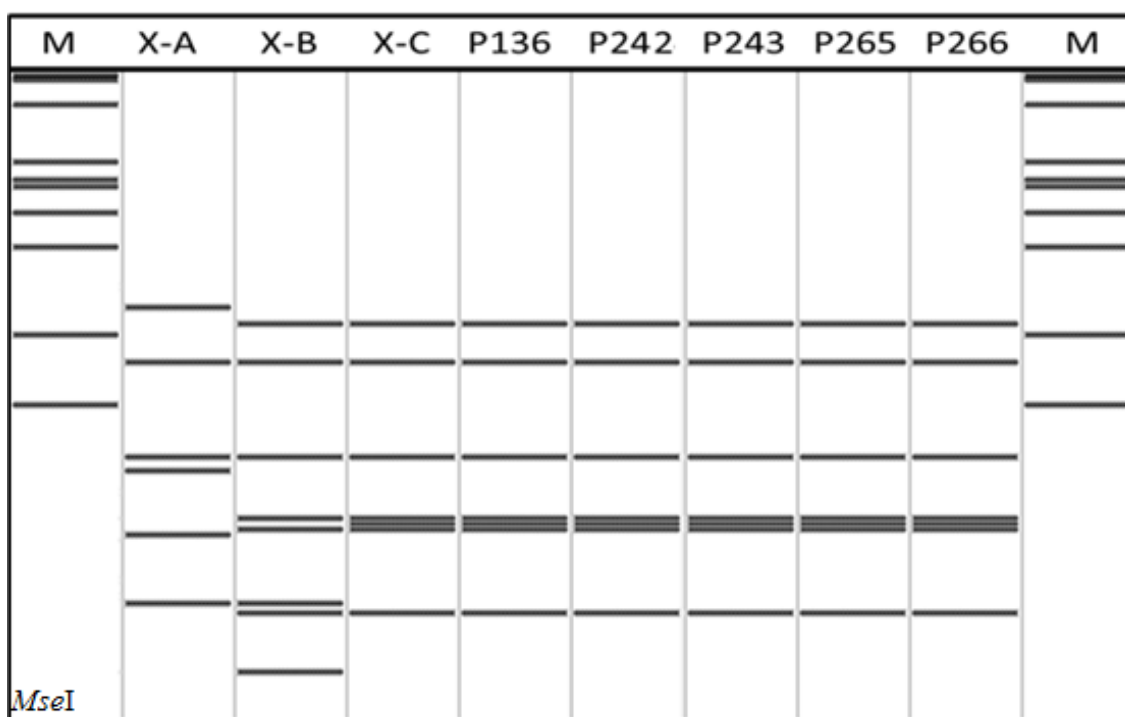


Figura 14. Análisis virtual en gel de poliacrilamida al 6% que muestra los perfiles de RFLP; obtenidos a partir de la digestión del gen *16S rRNA*, con la enzima *MseI*, en muestras de peral. Secuencias de fitoplasma utilizadas como referencias: AP-15 (16SrX-A), LNP (16SrX-B), PD (16SrX-C). Con muestras de peral: Pom136, Pom243, Pom265 y Pom266; M: marcador molecular.

Luego, para continuar con la identificación de las muestras chilenas Pom136, Pom243, Pom265 y Pom266 se realizó una segunda digestión virtual con la enzima *SspI* que generó perfiles idénticos a los aislados de referencia pertenecientes a los subgrupos ribosomales 16SrX-C y 16SrX-B (Figura 15). Considerando los resultados de RFLP virtuales realizados con *MseI* y *SspI*, se concluye que las muestras chilenas pertenecen a la especie 'Candidatus *Phytoplasma pyri*' (16SrX-C).

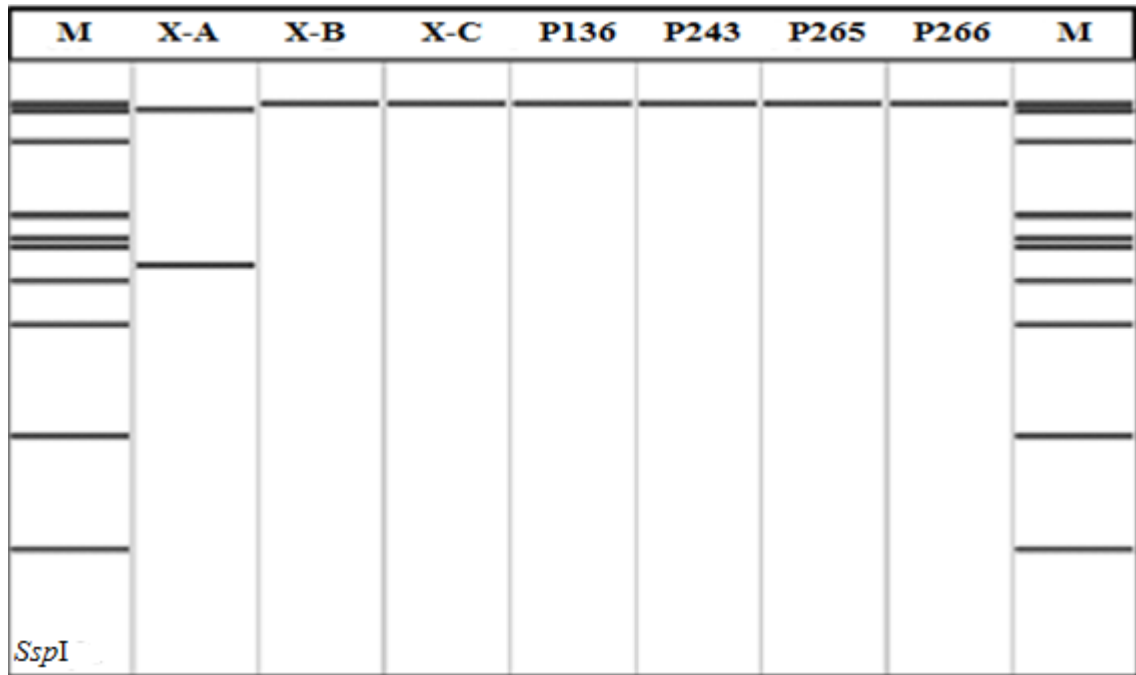


Figura 15. Análisis virtual en gel de poliacrilamida al 6% que muestra los perfiles de RFLP; obtenidos a partir de la digestión del gen *16S rRNA*, con la enzima *SspI*, en muestras de peral. Secuencias de fitoplasma utilizadas como referencias: AP-15 (16SrX-A), LNP (16SrX-B), PD (16SrX-C). Con muestras de peral: Pom136, Pom243, Pom265, Pom266; M: marcador molecular.

Para confirmar la presencia del fitoplasma 16SrIII-J en peral referente a la muestra Pom138, también se realizó una restricción enzimática *in silico*. Inicialmente se utilizó la enzima *HhaI*, la cual permitió asociar la muestra Pom138 con siete diferentes subgrupos ribosomales del grupo 16SrIII (C, D, F, J, M, N, Q), ya que presentan los mismos perfiles de RFLP (Figura 16).

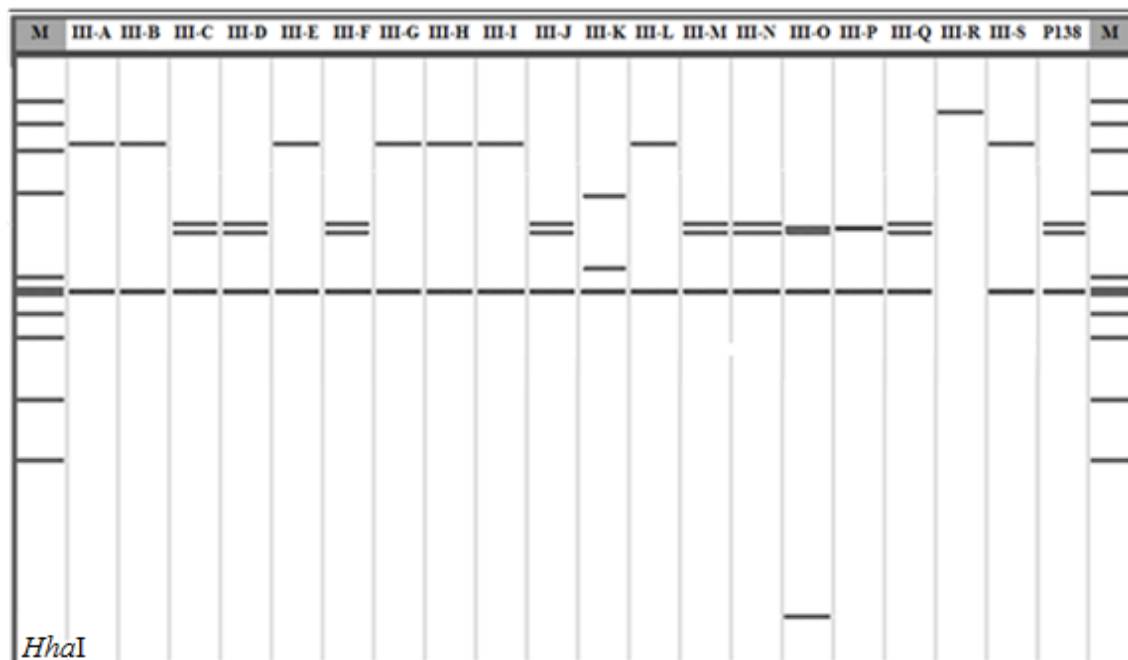


Figura 16. Análisis virtual en gel de poliacrilamida al 6% que muestra los perfiles de RFLP; obtenidos a partir de la digestión del gen *16S rRNA*, con la enzima *HhaI*, en muestras de peral. Secuencias de fitoplasma utilizadas como referencias: CX (16SrIII-A), CR (16SrIII-B), PB1 (16SrIII-C), GR1 (16SrIII-D), SP1 (16SrIII-E), MW1 (16SrIII-F), WWB (16SrIII-G), PoiLilo (16SrIII-H), VGYIII (16SrIII-I), Hort72 (16SrIII-J), SLF (16SrIII-K), FSDY17 (16SrIII-L), PPT-MT117-1 (16SrIII-M), PPT-AK6 (16SrIII-N), DanVir (16SrIII-O), DanVir (16SrIII-P), BRWB7 (16SrIII-Q), CirWL (16SrIII-R) y WX (16SrIII-S). Con la muestra de peral: Pom138; M: marcador molecular.

Se procedió con una segunda restricción enzimática usando *BstUI* y entre las siete referencias identificadas con la enzima *HhaI*, solo dos (16SrIII-J y 16SrIII-Q) presentaron perfiles idénticos a la muestra Pom138 (Figura 17).

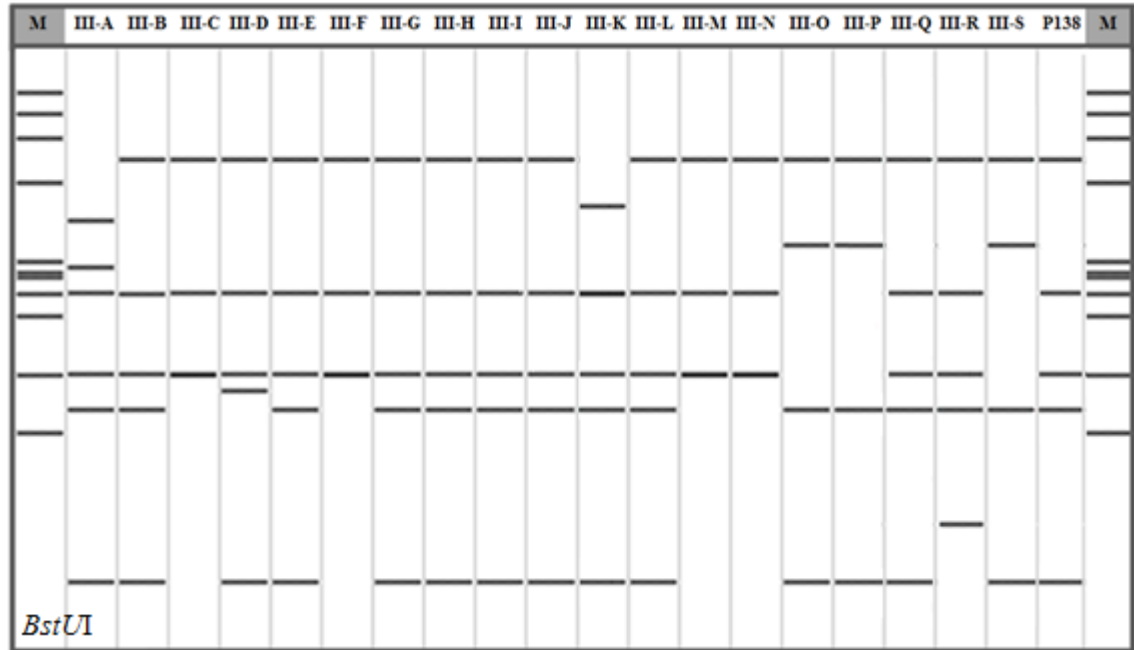


Figura 17. Análisis virtual en gel de poliacrilamida al 6% que muestra los perfiles de RFLP; obtenidos a partir de la digestión del gen *16S rRNA*, con la enzima *BstUI*, en muestras de peral. Secuencias de fitoplasmas utilizadas como referencias: CX (16SrIII-A), CR (16SrIII-B), PB1 (16SrIII-C), GR1 (16SrIII-D), SP1 (16SrIII-E), MW1 (16SrIII-F), WWB (16SrIII-G), PoiLilo (16SrIII-H), VGYIII (16SrIII-I), Hort72 (16SrIII-J), SLF (16SrIII-K), FSDY17 (16SrIII-L), PPT-MT117-1 (16SrIII-M), PPT-AK6 (16SrIII-N), DanVir (16SrIII-O), DanVir (16SrIII-P), BRWB7 (16SrIII-Q), CirWL (16SrIII-R) y WX (16SrIII-S) BRWB7 (16SrIII-Q). Con la muestra chilena de peral: Pom138; M: marcador molecular.

Finalmente, para discriminar entre los fitoplasmas pertenecientes a los subgrupos ribosomales 16SrIII-J y 16SrIII-Q, se realizó una última restricción enzimática virtual, utilizando *RsaI*, que permitió identificar el fitoplasma referente a la muestra Pom138 como 16SrIII-J (Figura 18).

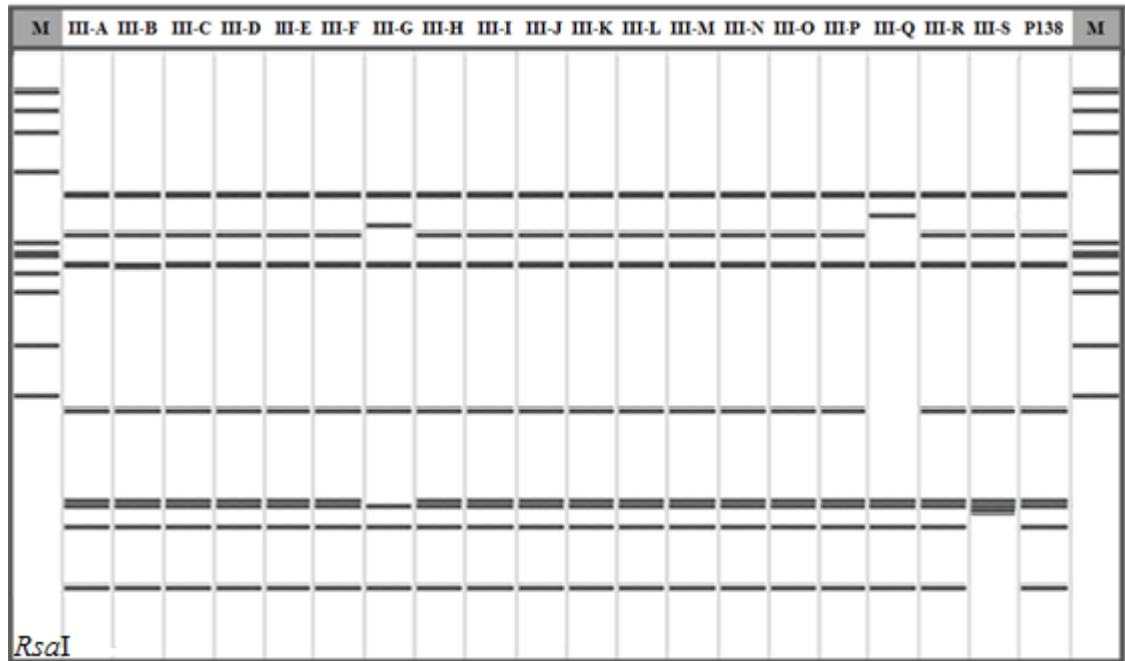


Figura 18. Análisis virtual en gel de poliacrilamida al 6% que muestra los perfiles de RFLP; obtenidos a partir de la digestión del gen *16S rRNA*, con la enzima *RsaI*, en muestras de peral. Secuencias de fitoplasma utilizadas como referencias: CX (16SrIII-A), CR (16SrIII-B), PB1 (16SrIII-C), GR1 (16SrIII-D), SP1 (16SrIII-E), MW1 (16SrIII-F), WWB (16SrIII-G), PoiLilo (16SrIII-H), VGYIII (16SrIII-I), Hort72 (16SrIII-J), SLF (16SrIII-K), FSDY17 (16SrIII-L), PPT-MT117-1 (16SrIII-M), PPT-AK6 (16SrIII-N), DanVir (16SrIII-O), DanVir (16SrIII-P), BRWB7 (16SrIII-Q), CirWL (16SrIII-R) y WX (16SrIII-S) BRWB7 (16SrIII-Q). Con la muestra de peral: Pom138; M: marcador molecular.

DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

En la prospección realizada 58 muestras presentaron síntomas causados posiblemente por fitoplasmas. Sin embargo, sólo 11 de estas (19,0%) dieron resultados positivos mediante nested-PCR. Los síntomas observado en las tres plantas positivas de manzano son mosaico puntiforme, manchas cloróticas, hojas pequeñas y acucharadas, borde de las hojas con mancha necróticas, proliferación de brotes, estípulas de mayor tamaño y escaso vigor. Solo algunos de estos síntomas son similares con aquellos normalmente asociados a la presencia de '*Candidatus Phytoplasma mali*' (Schaper y Seemüller, 1982; Seemüller *et al.*, 1984). En otro estudio se ha observado que '*Candidatus Phytoplasma mali*' es responsable también de deformaciones de la lámina foliar (Tedeschi y Alma., 2004). Por otro lado, las plantas muestreadas también presentaron mosaico puntiforme, manchas cloróticas, borde de las hojas con mancha necróticas, sintomatología que puede ser producto de la coinfección con virus o viroides.

En peral se observó que la variedad Bosc muestreada en primavera manifestó amarilleces, hojas pequeñas y brotes arrosados, sin embargo la variedad Williams muestreada en otoño presentó síntomas como enrojecimiento de hojas, necrosis del floema, hojas con epinastia, defoliación prematura y frutos deformados. Finalmente, la variedad Abate Fetel, muestreada en otoño, presentaba enrojecimiento de las hojas, escaso vigor, enrollamiento de hojas hacia el envés y necrosis del floema. Esta última combinación de síntomas normalmente resulta asociada con el “declinamiento del peral” (PD), causados por el fitoplasma del subgrupo ribosomal 16SrX-C (García, 2004). El mismo autor precisa que la expresión sintomatológica es variable y depende de diferentes factores, como la estación, la edad de la planta, la susceptibilidad varietal, el estado sanitario general del material utilizado o incluso las condiciones climáticas, como temperatura y humedad relativa que también influyen la presencia y densidad de población de los insectos vectores. Otro factor que influye notablemente en la expresión sintomatológica es la carga de fitoplasmas presentes en las plantas. A mayor concentración aumenta el taponamiento del floema, bloqueando así el transporte de nutrientes a los diferentes órganos de la planta, generando también un desequilibrio de los reguladores de crecimiento (Lee *et al.*, 2000; Christensen *et al.*, 2005; Bertaccini y Duduk, 2009). Cada vez es más común encontrar trabajos acerca de los mecanismos por los cuales los fitoplasmas son capaces de modificar la morfología de las plantas infectadas. Es el caso de la cepa OY de "*Ca. P. asteris*", para la cual se evaluó la función de una proteína fitoplásmica de 4,5 kDa (TENGU), que se ha probado ser capaz de suprimir la respuesta de la planta a las auxinas, con inducción de morfología anómala, cómo escobas de bruja y enanismo (Hoshi *et al.*, 2009).

En este estudio, con el análisis del gen *tuf* se ha determinado que 3 de los 28 árboles de manzano con síntomas estaban infectados por el fitoplasma del grupo ribosomal 16SrIII (*X-disease* group) y 8 de 30 árboles de peral con síntomas, estaban infectados por fitoplasmas pertenecientes a los subgrupos ribosomales 16SrIII-J (3 plantas) y 16SrX-C (5 plantas).

En el caso de los fitoplasmas en peral, se observa que la sintomatología asociada al hospedero es similar a pesar de ser plantas infectadas por dos fitoplasmas diferentes. Esto concuerda con lo descrito por Davis y Sinclair (1998), ellos observaron que en una misma especie vegetal, síntomas similares pueden ser inducidos por diferentes fitoplasmas, mientras que diferentes tipos de síntomas pueden ser inducidos por fitoplasmas taxonómicamente relacionados.

Las restantes muestras con síntomas de ambos frutales (25 de manzano y 22 de peral) resultaron negativas a los análisis moleculares. Esto podría explicarse por la presencia de otros tipos de patógenos o a la acción de factores abióticos. También la baja concentración de fitoplasmas en la muestra podría haber condicionado el resultado de los análisis. Estos microorganismos habitan el tejido floemático de las plantas y con frecuencia con bajo título (Lee *et al.*, 1995; Wei *et al.*, 2000; Harrison *et al.*, 2002; Firrao *et al.*, 2007), por lo que en muchas ocasiones no se pueden detectar.

Los porcentajes de detección obtenidos durante este estudio no deben inducirnos a minimizar la importancia de los fitoplasmas encontrados en esta investigación, ya que el fitoplasma 16SrIII-J ha sido reportado en Chile en diversos cultivos y asociado a diferentes enfermedades, como en cerezo con decaimiento (González *et al.*, 2011), en la vid con amarilleces (Fiore *et al.*, 2010) y en la remolacha causando la enfermedad denominada marchitez amarilla de la remolacha (Fiore *et al.*, 2015a). Además se ha descrito en *Galega officinalis* L., maleza asociada a varios cultivos en Chile (Fiore *et al.*, 2014). Finalmente, ha sido demostrado que el fitoplasma 16SrIII-J es transmitido en Chile también por los cicadélidos *Paratanus exitiosus* (Fiore *et al.*, 2012) y *Bergallia valdiviana* (Quiroga *et al.*, 2014). Ambos insectos se encuentran ampliamente distribuidos en el país, en malezas, principalmente correhuela y galega, encontradas con frecuencia en huertos de peral y manzano. Cuando estas malezas se eliminan el insecto puede visitar ocasionalmente las plantas de estos frutales para alimentarse, transmitiendo así el fitoplasma. Por lo tanto, la presencia de insectos vectores en los huertos, sugiere una mayor dispersión del fitoplasma 16SrIII-J en los cultivos de peral y manzano. El mismo comportamiento se ha observado en el cultivo de ajo en Argentina (Galdeano *et al.*, 2013).

Hasta la fecha, no se había reportado la presencia de fitoplasmas en pomáceas en Chile. Particularmente, fitoplasmas del grupo ribosomal 16SrIII tampoco habían sido asociado ni a manzano ni a peral en el mundo. En este trabajo se pudo correlacionar la presencia del fitoplasma perteneciente al subgrupo ribosomal 16SrIII-J con una sintomatología idéntica a la reportada en perales infectados con ‘*Candidatus Phytoplasma pyri*’, agente etiológico del decaimiento del peral, confirmado particularmente en la muestra Pom138 por la amplificación y caracterización molecular del gen *16S rRNA*. Este dato es de gran importancia, ya que el riesgo de diseminación de este patógeno en Chile es alto, debido a los factores epidemiológicos explicados anteriormente.

De los fitoplasmas identificados en manzano, la muestra Pom275 presentó un 99,7% de identidad con la referencia Hort72, del subgrupo 16SrIII-J, pero su perfil de RFLP presentó una diferencia, observándose un punto de corte adicional con *MseI*. Esta diferencia se debe a una mutación puntual, un cambio de guanina por adenina. Las implicancias de esta mutación en aspectos funcionales del factor de elongación *tuf* es mínima, ya que se genera un cambio de aminoácidos de características bioquímicas similares (arginina por tirosina).

Respecto a las muestras Pom176 y Pom262 (manzano) el estudio filogenético indica que pertenecen al grupo ribosomal 16SrIII (*X-disease* group), pero los RFLP observados no permiten asociarlo a ninguno de los subgrupos ribosomales actualmente secuenciados para el gen *tuf*. La mayor cantidad de información genética de fitoplasmas disponible en GenBank se basa en el gen que codifica el ARN ribosomal *16S rRNA*, gen

que no se logró amplificar de manera exitosa, lo que puede ser explicado por la suma de las razones expuestas anteriormente y además por la longitud del gen a amplificar, ya que los partidores para el gen *tuf* amplifican 450 pb aproximadamente y los partidores orientados al gen *16S rRNA* amplifican 1.250 pb. Para solucionar esto, se realizaron inoculaciones en plantas indicadoras, para enriquecer el título del fitoplasma y así obtener la cantidad de ADN suficiente para la caracterización molecular, experimento que continúa en desarrollo.

En cuanto al fitoplasma 16SrX-C, es la primera detección en peral en Chile y Sudamérica, confirmado por análisis filogenéticos y RFLP en los genes *tuf* y *16S rRNA*. Este reporte es de alta importancia, debido al actual estado de enfermedad cuarentenaria ausente, según el Servicio Agrícola y Ganadero, para el agente etiológico '*Candidatus phytoplasma pyri*'. Las pérdidas económicas reportadas a nivel mundial, asociadas al "*pear decline*", hacen que esta detección sea tema de preocupación, más aún cuando la sintomatología observada a finales de verano y en otoño, en diferentes huertos productivos, sea coincidente con la reportada a nivel mundial. Hasta el momento, en Chile no se ha reportado la presencia de los psílicos vectores de '*Ca. P. pyri*', pero esto no se descarta completamente, así como la capacidad de transmisión de otros psílicos reportados previamente en el país y asociados al peral, como *Cacopsylla bidens* (Burckhardt, 1994). Por esto, es de suma importancia la realización de estudios epidemiológicos asociados al "*pear decline*" y la evaluación del daño económico causado.

Es importante destacar que el '*Candidatus Phytoplasma pyri*' (16Sr X-C) puede haber sido introducido durante el proceso de obtención de material vegetal destinado a la propagación para el establecimiento de nuevas plantaciones en el país, por lo que más adelante puede tener implicaciones importantes en el progreso temporal y espacial de la enfermedad, ya que la dispersión de los fitoplasmas en la naturaleza depende principalmente del material de propagación y, en segundo lugar, de la capacidad de los insectos vectores para transmitirlos de plantas infectadas a plantas sanas. En este sentido se puede proponer un control eficiente de la enfermedad basado en la prevención, realizando un diagnóstico adecuado del fitoplasma en el material de propagación en conjunto con un control adecuado de los potenciales insectos vectores. Las mismas precauciones deben seguirse para el control del fitoplasma 16SrIII-J, más aun considerando que los vectores y reservorios se encuentran en Chile y que, según lo informado en este trabajo, es capaz de causar la misma enfermedad que el fitoplasma 16SrX-C en peral.

CONCLUSIONES

Con la prospección se logró recolectar un número considerable de muestras (192) desde las regiones Metropolitana, Libertador O'Higgins, El Maule, del Bío Bío y de la Araucanía en las que se detectó la presencia de dos fitoplasmas en el 19,0% de plantas con síntomas. El presente trabajo representa la base para la realización de futuras prospecciones cuyo fin sea establecer la incidencia de estos dos fitoplasmas en manzano y peral en el país o en una región en específico.

Por primera vez en Chile se ha detectado y caracterizado molecularmente fitoplasmas del grupo ribosomal 16SrIII en el cultivo del manzano y los fitoplasmas pertenecientes a los subgrupos ribosomales 16SrIII-J y 16SrX-C en peral. La de '*Candidatus Phytoplasma pyri*' es la primera detección en Chile y Sudamérica.

La identificación y caracterización genética del subgrupo ribosomal 16SrIII-J en manzano y peral, y la presencia de un subgrupo no identificado en manzano, perteneciente al grupo ribosomal 16SrIII, demostró que existen fitoplasmas asociados a pomáceas en Chile que difieren de aquellos presentes en otros países en los mismo cultivos.

BIBLIOGRAFIA

- Arismendi, N.; N. Andrade; R. Riegel and R. Carrillo. 2010. Presence of a phytoplasma associated to “witches’ broom” disease in *Ugni molinae* Turcz. And *Gaultheria phillyreifolia* (Pers.) Sleumer determined by DAPI, PCR and DNA sequencing. Chilean Journal of Agricultural Research 70: 26-33.
- Bertaccini, A. and B. Duduk. 2009. Phytoplasma y phytoplasma diseases: a review of recent research. *Phytopathologia Mediterranea* 48: 355-378.
- Burckhardt D. 1994. Generic key to Chilean jumping plant-lice (Homoptera: Psylloidea) with inclusion of potential exotic pests. *Rev. Chilena Ent.* 21:57-67
- Christensen, N., M., Axelsen, K.B., M. Nicolaisen and A. Schulz. 2005. Phytoplasmas and their interactions with hosts. *Trends in Plant Science* 10: 526-535.
- Davis, R.E.; R. Jomantiene; A. Kalvelyte and E.L. Dally. 2003. Differential amplification of sequence heterogeneous ribosomal RNA genes and classification of the ‘*Fragaria multicipita*’ phytoplasma. *Microbiology Research* 158: 229-236.
- Davis, R.E. and W.A. Sinclair. 1998. Phytoplasma identity and disease etiology. *Phytopathology* 88: 1372-1376.
- Deng, S. and C. Hiruki. 1991. Amplification of *16S rRNA* genes from culturable and non culturable mollicutes. *Journal of Microbiological Methods* 14: 53-61.
- Fiore, N.; F. González; A. Zamorano and A.M Pino. 2010. Molecular characterization of new phytoplasmas of grapevine in Chile. XIX Congreso de la Sociedad Chilena de Fitopatología, Pucón Chile 9 al 12 de Noviembre de 2010.
- Fiore, N.; V. Longone; F. González; A. Zambrano; A.M. Pino; J. Araya; S. Paltrinieri; L. Bertaccini; A. Alma and N. Contaldo. 2012. Transmission of 16SrIII-J phytoplasma by *Paratanus exitiosus* Leafhopper. Proceedings of the 17th Congress of ICVG: 230-231. Davis, California, USA.
- Fiore, N.; A. Zamorano; X. González; N. Quiroga. y A.M. Pino. 2014. Detección del fitoplasma 16SrIII-J en *Galega officinalis* L. Resumen XXIII Congreso SOCHIFIT, Talca, 3-5 diciembre 2014, p.15.
- Fiore, N.; A. Zamorano; X. González; N. Quiroga R., Paillalef and A.M. Pino. 2015a. Phytoplasmas associated with yellow wilt disease of sugar beet in Chile *Phytopathogenic Mollicutes* 5: 63-64.
- Firrao, G.; M. García and C. Marzachí. 2007. Phytoplasmas: genetics, diagnosis and relationships with the plants and insects host. *Frontiers in Bioscience.* 12:1353-1375.
- Galdeano, E.; F. Guzmán; F. Fernández and L. Conci. 2013. Genetic diversity of 16SrIII group phytoplasmas in Argentina. Predominance of subgroups 16SrIII-J and B and two new subgroups 16SrIII-W and X. *European Journal of Plant Pathology* 137(4): 753-764.

García, M. 2004. Detección, transmisión y caracterización del fitoplasma asociado a la enfermedad del decaimiento del peral. Tesis Doctoral. Barcelona, España: Departamento de Biología Animal, Vegetal y Ecología, Universidad Autónoma de Barcelona. 146p.

González, F.; A. Zamorano; A.M. Pino and N. Fiore. 2011. Identification of phytoplasma belonging to X-disease group in cherry in Chile. *Bulletin of Insectology* **64**: S235-S236.

Gundersen, D.E. and Y.M. Lee. 1996. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primers pairs. *Phytopathol. Mediterr.* 35:144-151.

Hall, T.A. 1999. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Serie N°* 41:95-8.

Harrison, N.A.; W. Myrie; P. Jones; M.L. Carpioi; M.M Castillo; M. Doyle and C. Oropeza. 2002. *16S rRNA* interoperon sequence heterogeneity distinguishes strain populations of palm lethal yellowing phytoplasma in the Caribbean region. *Annals of the Applied Biology* 141:183-193.

Hepp, R.; C. Sandoval; J. Romero y S. Castro. 1998. Detección de un fitoplasma en manzanos con síntomas de Rubbery Wood mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR): *In VIII Congreso Nacional de Fitopatología*, Chillán. 28-30 de octubre de 1998. Sociedad Chilena de Fitopatología, Santiago, Chile.

Hogenhout, S. A.; K. Oshima; E. Ammar; S. Kakizawa; N. Kingdom and S. Namba. 2008. Phytoplasmas: bacteria that manipulate plants and insects. *Molecular Plant Pathology*, 9(4): 403-423.

Hoshi, A.; K. Oshima; S. Kakizawa; Y. Ishiia; J. Ozeki; M. Hashimoto; K. Komatsu; S. Kagiwada; Y. Yamaji and S. Namba. 2009. A unique virulence factor for proliferation and dwarfism in plants identified from a phytopathogenic bacterium. *PNAS* 106: 6416-6421.

Jakovljevic, V.; P. Otten; C. Berwarth; A. Krähmer and W. Jelkmann. 2015. Search for the causal agent of apple rubbery wood disease: RNA-seq and wood structure analysis. 23rd International Council for the Study of Virus and other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops (ICVF) Meeting. 7-12 June, Morioka, Japan.

Lee, I.M.; A. Bertaccini; M. Vibio and D.E. Gundersen. 1995. Detection of multiple phytoplasmas in perennial fruit trees with decline symptoms in Italy. *Phytopathology* 85:728-735.

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

Makarova, O.; N. Contaldo; S. Arenas; G. Kawube; A. Bertaccini and N. Mogens. 2012. DNA Barcoding for Identification of 'Candidatus Phytoplasmas' Using a Fragment of the Elongation Factor Tu Gene. *PLoS ONE* 7(12): e52092.

McCoy, R.; A. Caudwell; C. Chang; T. Chen; L. Chykowski; M. Cousin; J. Dale; J. de Leeuw; D. Golino; K. Hackett; B. Kirkpatrick; R. Marwitz; H. Petzold; R. Sinha; M. Sugiura; R. Whitcomb; Y. Yang; B. Zhu y E. Seemüller. 1989. Plant diseases associated with mycoplasma-like organisms. Pp 546-640. En: Whitcomb, R. y Tully, J. (eds.). *The Mycoplasmas* Vol. V Academic Press New York.

Odepa, 2015. Superficie de frutales por región. [en línea]. Chile. Recuperado en: <http://www.odepa.cl/superficie-de-frutales-por-region-2/> Consultado el: 29 de Diciembre de 2015.

Poggi-Pollini, C.; L. Giunchedi; G. Filippini; E. Seemuller and E. Vindimian. 1995. Etiological studies of apple rubbery wood disease. *Acta Horticulturae*, The Hague, v.386, p.503-505.

Prince, J. P.; R.E. Davis; T.K. Wolf; I.M. Lee; B.D. Mogen; E.L. Dally; A. Bertaccini; R. Credi and M. Barba. 1993. Molecular detection of diverse mycoplasma-like organisms (MLOs) associated with grapevine yellows and their classification with aster yellows, X-disease, and elm yellows MLOs. *Phytopathol.* 83:1130-1137.

Quiroga, N.; X. González; A. Zamorano; A.M. Pino; L. Picciau; A. Alma; S. Paltrinieri; N. Contaldo; A. Bertaccini y N. Fiore. 2014. Transmisión del fitoplasma 16SrIII-J a través del cicadélido *Bergallia valdiviana* Berg 1881. Resumen XXIII Congreso SOCHIFIT, Talca, 3-5 diciembre 2014, p.16.

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

Schaper, U. and E. Seemuller. 1982. Condition of the phloem and the persistence of mycoplasma like organisms associated with apple proliferation and pear decline. *Phytoplasmas* 72: 736-742.

Seemuller, E.; U. Schaper and E. Zimmermann. 1984. Seasonal variation in the colonization patterns of mycoplasma like organisms associated with apple proliferation and pear decline. *J. Plant Dis.Protect.*91: 371-382.

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

Tedeschi, R. and A. Alma. 2004. Transmission of Apple Proliferation Phytoplasma by *Cacopsylla melanoneura* (Homoptera: Psyllidae). *Journal of Economic Entomology* 97 (1): 8-13.

Tamura, K.; J. Dudley; M. Nei and S. Kumar. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599.

Thompson J.D.; T.J. Gibson; F. Plewniak; F. Jeanmougin and D.G. Higgins. 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 25: 4876-4882.

Wei W.; H. Kawakita and M. Sato. 2000. Detection of a small population of mulberry dwarf (MD)-phytoplasmas in symptomless-mulberry trees by nested PCR. *Journal of Sericultural Science of Japan* 69:261-269.

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

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

APENDICE

Tabla 7. Síntomas de las plantas correspondientes a muestras positivas a fitoplasmas. Detección realizada en los genes *tuf* y *16S rRNA*.

Muestra	Especie	Región	Época/ muestreo	Variedad	Descripción de los Síntomas	Caracterización realizada	
						Gen <i>tuf</i>	Gen <i>16S rRNA</i>
POM 78	Peral	Maule	Otoño	D'Anjou	Enrojecimiento de hojas, leve necrosis del floema, escaso vigor	X	
POM 136	Peral	O'Higgins	Primavera	Bosc	Amarillez, hojas pequeñas	X	X
POM 138	Peral	O'Higgins	Primavera	desconocida	Arrosetamiento de hojas, hojas pequeñas	X	X
POM 176	Manzano	Maule	Primavera	Royal Gala	Mosaico puntiforme, manchas cloróticas, hojas pequeñas y acucharadas, borde de las hojas con mancha necróticos	X	
POM 242	Peral	Maule	Verano	Carmen	Enrojecimiento de hojas desde la extremidad hacia la base	X	
POM 243	Peral	Maule	Verano	Abate Fetel	Enrojecimiento de hojas, escaso vigor, Encarrujamiento de hojas al envés, necrosis del floema	X	X
POM 262	Manzano	Araucanía	Otoño	Fuji	Hojas deformes, proliferación de brotes	X	
POM 265	Peral	Bío Bío	Otoño	Williams	Enrojecimiento de algunas hojas , algunas hojas con epinastia, leve necrosis del floema	X	X
POM 266	Peral	Bío Bío	Otoño	Williams	Enrojecimiento de hojas, epinastia, fuerte necrosis del floema, fruto deformado	X	X
POM 275	Manzano	O'Higgins	Otoño	Royal Gala	Escaso crecimiento, estípulas grandes	X	
POM 282	Peral	Maule	Otoño	Abate Fetel	Enrojecimiento de hojas, defoliación anticipada, leve necrosis del floema, brazo muerto	X	