

DISEÑO DE TRANSMISIÓN DE FITOPLASMAS A *Catharanthus roseus* COMO RESERVORIO NATURAL

LUIS ROBERTO REVELES-TORRES ROBERTO PADILLA-RAMOS
SILVIA SALAS-MUÑOZ RODOLFO VELASQUEZ-VALLE



**SECRETARÍA DE AGRICULTURA, GANADERÍA,
DESARROLLO RURAL, PESCA Y ALIMENTACIÓN**

M.A. JOSÉ EDUARDO CALZADA ROVIROSA
Secretario

LIC. JORGE ARMANDO NARVÁEZ NARVÁEZ
Subsecretario de Agricultura

M.C. MELY ROMERO CELIS
Subsecretario de Desarrollo Rural

M.C. RICARDO AGUILAR CASTILLO
Subsecretario de Alimentación y Competitividad

**INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES
FORESTALES, AGRÍCOLAS Y PECUARIAS**

DR. RAFAEL AMBRIZ CERVANTES
Encargado del Despacho de los Asuntos de la Dirección General

DR. RAÚL G. OBANDO RODRÍGUEZ
Coordinador de Investigación, Innovación y Vinculación

M. C. JORGE FAJARDO GUEL
Coordinador de Planeación y Desarrollo

MTRO. EDUARDO FRANCISCO BERTERAME BARQUÍN
Coordinador de Administración y Sistemas

CENTRO DE INVESTIGACIÓN REGIONAL NORTE CENTRO

DR. ARTURO DANIEL TIJERINA CHÁVEZ
Director Regional

DR. FRANCISCO JAVIER PASTOR LÓPEZ
Director de Investigación

ING. RICARDO CARRILLO MONSIVÁIS
Director de Administración

MC. RICARDO ALONSO SÁNCHEZ GUTIÉRREZ
Director de Coordinación y Vinculación en Zacatecas

DISEÑO DE TRANSMISIÓN DE FITOPLASMAS A *Catharanthus roseus* COMO RESERVORIO NATURAL

Instituto Nacional de Investigaciones Forestales,
Agrícolas y Pecuarias
Progreso No. 5, Barrio de Santa Catarina
Delegación Coyoacán
México, D.F.
C.P. 04010 México, D.F.
Teléfono (55) 3871-8700

ISBN: 978-607-37-0844-9

Primera Edición: Noviembre 2017

No está permitida la reproducción total o parcial de esta publicación, ni la transmisión de ninguna forma o por cualquier medio, ya sea electrónico, mecánico, fotocopia o por registro u otros métodos, sin el permiso previo y por escrito a la institución.

Cita correcta:

Reveles-Torres L.R., Padilla-Ramos R., Salas-Muñoz S. y Velásquez-Valle R. 2017. Diseño de transmisión de fitoplasmas a *Catharanthus roseus* como reservorio natural. Folleto Técnico Núm 87. Campo Experimental Zacatecas. CIRNOC – INIFAP, 57 páginas.

CONTENIDO

Introducción.....	1
Los fitoplasmas y el motor de la evolución.....	3
Biología y características generales de los Fitoplasmas.....	4
Clasificación integral de Fitoplasmas.....	8
Posición filogenética de los Fitoplasmas.....	9
Sistema taxonómico provisional para fitoplasmas.....	12
Cuestiones relativas a la delimitación de especies.....	15
Especificidad de fitoplasmas en los hospedantes.....	16
Genómica y Mecanismos de Patogenicidad.....	18
Transferencia horizontal de genes: un atajo para la virulencia.....	23
Transmisión.....	24
Técnicas para el mantenimiento y propagación de fitoplasmas en <i>Catharanthus roseus</i>	28
Técnicas de transmisión de fitoplasmas por insectos vectores.....	29
Materiales y Métodos.....	32
Preparación y recolecta de material biológico.....	32
Infestación sistémica.....	35
Periodo de incubación.....	37
Resultados.....	38
Aparición de síntomas.....	38
Detección molecular de fitoplasmas plantas e Insectos.....	39
Propagación por Injertos.....	41
Conclusiones.....	45
Literatura Citada.....	47

DISEÑO DE TRANSMISIÓN DE FITOPLASMAS A *Catharanthus roseus* COMO RESERVORIO NATURAL

*Luis Roberto Reveles-Torres*¹

*Roberto Padilla-Ramos*²

*Silvia Salas-Muñoz*³

*Rodolfo Velázquez-Valle*¹

Introducción

Hace 10 000 años, la domesticación de ciertas plantas y animales modificó de manera drástica las estructuras sociales, políticas y económicas. La agricultura representa una de las grandes revoluciones que ha protagonizado la humanidad y, quizás, el punto de inflexión para las sociedades científicas modernas. Sin embargo esta transición que trajo consigo el futuro, también requirió de un mayor conocimiento sobre los procesos ecológicos, evolutivos, filogenéticos y biogeográficos de los agentes causales de enfermedades en los cultivos de importancia económica, y de manera colateral, los enfoques para lograr el manejo eficaz de las enfermedades, así como los procesos tecno-científicos para un mejor entendimiento de éstas.

Dentro de una amplia gama de organismos, los fitoplasmas tienen un lugar preponderante por el impacto de su infección

¹ Investigadores del Programa de Biología Molecular, y del Programa de Fitopatología del CEZAC-. ² Biólogo egresado de la licenciatura de Biología de la Universidad Autónoma de Zacatecas. ³ Investigador Catedrático CONACYT-Campo Experimental Zacatecas

sobre un gran número de cultivos hortícolas, frutícolas, cerealeros y plantas de importancia ecológica.

En los últimos años se han hecho importantes avances sobre el conocimiento de los procesos de infección en el desarrollo de las plantas, la sintomatología y la especificidad en los hospederos. Sin embargo, los fitoplasmas aún no han podido ser cultivados en medios de cultivo, hecho que ha sido solventado con la utilización de ciertas plantas como hospederos naturales, tales como la Teresita o Periwinkle de Madagascar (*Catharanthus roseus* L.) tanto en invernadero como en micropropagación. Estos reservorios de cepas de fitoplasmas han contribuido a un mejor estudio de este fitopatógeno a nivel mundial.

Como una estrategia de conformar un cepario de los fitoplasmas detectados tanto a nivel local, como regional, dentro de las investigaciones del INIFAP, el objetivo de este trabajo fue el de crear un cepario inicial de fitoplasmas, que sirva de reservorio para futuras investigaciones en el entendimiento y control de estos fitopatógenos.

En esta contribución se detallan las metodologías y materiales para experimentos de transmisión controlada mediante el uso de poblaciones naturales de la chicharrita (*Circulifer tenellus*), la cual está señalada como el vector principal de fitoplasmas en el estado de Zacatecas.

Los fitoplasmas y el motor de la evolución.

Los parásitos han evolucionado para convertirse en una de las formas más exitosas de vida en la tierra, representan el principal motor de la evolución y son una importante fuerza de selección entre las poblaciones, modelando los genotipos y conduciéndolos a una diversidad genética de las defensas de sus hospederos, han dado forma a los ecosistemas y son los principales arquitectos de algunos de los hitos más importantes de la vida como el sexo (Zimmer, 2000). Entre estos importantes agentes de selección natural, los fitoplasmas ocupan un lugar notable por su biología única y su capacidad para colonizar dos sistemas completamente distintos y evolutivamente distantes. Los fitoplasmas parasitan a las plantas superiores que conforman una sexta parte de todas las especies descritas y a los insectos que representan casi dos terceras partes de los seres vivos, estos dos grupos dominan la flora y la fauna terrestre. Por lo tanto, comprender los procesos históricos y mecanicistas, de esta interacción tripartita supone comprender una parte fundamental de la vida. Los fitoplasmas pertenecen al grupo de organismos con la mayor diversidad evolutiva (Margulis y Chapman, 2009) y su estudio representa un importante campo para el desarrollo teórico de nuevos conceptos dentro de la biología evolutiva y el perfeccionamiento de herramientas genéticas y moleculares para su comprensión, es decir la suma conceptual y metodológica de una biología cuyos límites empiecen a dibujar la nueva síntesis y de manera colateral una nueva filosofía de las ciencias de la vida.

Biología y características generales de los Fitoplasmas.

Los fitoplasmas son patógenos bacterianos que se identificaron por primera vez en 1967 en secciones ultrafinas del floema vegetal de plantas infectadas con la enfermedad de amarillamiento, una patología vegetal que anteriormente se pensaba que era causado por un virus. Debido a que su morfología observada fue similar a un grupo de mollicutes patógenos de animales (bacterias que carecen de paredes celulares) llamados micoplasmas, se denominaron organismos similares a micoplasmas o MLOs (Doi *et al.*, 1967). Posteriormente, se descubrió que algunas enfermedades vegetales tenían MLOs asociadas a ellas, y los análisis filogenéticos de las secuencias de ADN de estos organismos mostraron que eran un gran grupo monofilético dentro de los mollicutes por lo que el término fitoplasma fue propuesto y adoptado para describirlos (Dickinson y Hodgetts, 2012).

Los fitoplasmas tienen genomas pequeños que van de 530 a 1,350 Kb (son los organismos más pequeños con capacidad de auto replicación) y un bajo contenido en su relación de Guanina y Citosina de su ADN (23,0-29,5% Mol), los fitoplasmas se han asignado a un nuevo género "*Candidatus Phytoplasma*" (Firrao *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2010). Esta categoría de *Candidatus* es utilizada por taxónomos para clasificar organismos tales como fitoplasmas que no pueden ser cultivados *in vitro*. Mediante la amplificación de secuencias altamente conservadas de regiones del gen ribosomal 16S (ADN 16Sr) por reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) y sobreponiendo los productos finales de una digestión enzimática del genoma con enzimas de restricción por

medio de RFLPs (polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción, por sus siglas en Inglés), ha sido posible clasificar a los fitoplasmas en más de 28 grupos de 16Sr (Dickinson *et al.*, 2012).

Su tamaño y crecimiento depende del grado de desarrollo de los tubos cribosos donde se localizan, y tiene la capacidad de pasar lentamente a través de los poros de las células cribosas del floema. La célula del fitoplasma está rodeada por una membrana plasmática trilaminar, de unas 10 micras de grosor, compuesta igualmente que en el resto de los procariontes, de dos tercios de proteínas y un tercio de lípidos. Su citoplasma contiene ribosomas para la síntesis de proteínas, y una molécula de ADN de doble cadena circular. Se ha detectado también la presencia de ADN extracromosómico de tipo plasmídico (Nishigawa *et al.*, 2001).

El genoma tiene un alto contenido en genes (Kirkpatrick *et al.*, 1994b). Presenta un único gen de rRNA isoleucina, común en todos los fitoplasmas (Lee *et al.*, 1994) por estudios moleculares también se ha visto que los fitoplasmas contienen un gen que codifica para una proteína de membrana y ésta es única para cada especie. Estas proteínas son abundantes en la superficie externa de la célula, y de su estudio se podría explicar la posible interacción fitoplasma-huésped (Camarena Gutiérrez *et al.*, 2008).

Los fitoplasmas pueden visualizarse en material infectado por medio de microscopia, su morfología se describe a

menudo como pleomórficos, redondeados o con forma filamentosos (Lee *et al.*, 2000) como otros mollicutes, los fitoplasmas carecen de pared celular (Doi *et al.*, 1967) Debido a que no se han podido cultivar aun en medios axénicos, para visualizarlos se ha tendido a usar microscopistas expertos y técnicas que incluyen fijación de tejidos por tinción con diamidino-2-phenylindole (DAPI) () y microscopia de fluorescencia o microscopia eléctrica de transmisión. Además, los métodos de bio imagen han sido desarrollados usando tintes fluorescentes y microscopia de escáner laser confocal para visualizar a los fitoplasmas *in situ* (Dickinson *et al.*, 2012).

Una característica evidente de los fitoplasmas es que tienen un ciclo de vida inusual comparado con cualquier otro patógeno vegetal, y el descubrir este hecho, fue el objetivo inicial de todas las investigaciones moleculares referentes a estos micro organismos. En efecto, otros patógenos como las bacterias y los hongos utilizan ciertos mecanismos celulares para poder penetrar a las plantas e invadir espacios entre las células de estas (Block *et al.*, 2008). En contraste, los fitoplasmas habitan en el citoplasma de las células vegetales. Como estos organismos residen intracelularmente, no necesitan de los mecanismos celulares de los que se valen las bacterias y los hongos (Hogenhout y Loria, 2008), sino que utilizan otros complejos basados en proteínas llamadas “efectores”, los cuales modifican la permeabilidad de las células para invadirlas (Kakizawa *et al.*, 2004).

Otro aspecto peculiar de los fitoplasmas es que su rango de hospederos incluye organismos de dos reinos taxonómicos distintos, pues infecta a plantas (Reino Plantae) y a los

insectos (Reino Animalia), cualidad que como patógeno es única, lo que implica la capacidad de éxito para propagarse. Otra característica de los fitoplasmas, es que son capaces de invadir y acumularse en diferentes células y tejidos de sus insectos vectores, los cuales son las chicharritas de la familia Cicadelidae (Bai, 2004).

En las plantas, los fitoplasmas están restringidos en el citoplasma de las células cribosas del floema. Estas células no poseen núcleo y contienen solo organelos limitados, como los ribosomas, pequeñas vacuolas y grandes plasmodesmos (Turgeon y Wolf, 2009). Con estos últimos, se establecen comunicaciones citoplasmáticas que atraviesan la pared celular entre células contiguas, formando así una red vascular en toda la planta (Samanani *et al.*, 2006). De la misma manera, los plasmodesmos se conectan con otras células acompañantes que nutren el tamiz celular, en las cuales, estas poseen placas que tienen poros pequeños para permitir el transporte sistémico de azúcares y otros nutrientes en la planta (Lough y Lucas, 2006).

Los fitoplasmas que sistemáticamente infectan a la planta, se mueven a través de los poros de las placas de tamiz, extendiéndose de ese modo a todo lo largo del sistema vascular de la planta (Sugio y Hogenhout, 2012), es decir, que por esta vía, estos microorganismos invaden cualquier tejido vegetal como raíces, hojas, tallos, ramas, brotes, frutos y parece ser con datos aun no confirmados, que llegan a infectar incluso a las semillas (Olivares-Mercado, 2013).

Los fitoplasmas pueden pasar el invierno en vectores infectados, así como en las plantas perennes que les sirven como reservorios desde donde se propagan en la primavera siguiente. La habilidad de los fitoplasmas para invadir y colonizar exitosamente dos ambientes hospederos tan diferentes, y reproducirse intracelularmente en ambos, es notable e implica el reconocimiento sobre la evolución de mecanismos que permiten a estos microorganismos modificar y controlar los procesos celulares tanto en plantas como en insectos (Reveles-Torres *et al.*, 2015).

Clasificación integral de Fitoplasmas.

Por décadas, la falta de un sistema de clasificación global para los fitoplasmas dificultó las investigaciones en casi todos los aspectos. No se pudo aclarar las etiologías de numerosas enfermedades desconcertantes y las identidades de los fitoplasmas asociados con tales enfermedades. El uso de la PCR para amplificar las secuencias del gen 16S rRNA hizo posible detectar una amplia gama de fitoplasmas asociadas con enfermedades en cientos de especies de plantas. Inicialmente, se hicieron intentos para identificar y clasificar fitoplasmas desconocidos basados en el análisis filogenético del gen 16S rRNA amplificado (Kuske y Kirkpatrick, 1992; Namba *et al.*, 1993; Schneider *et al.*, 1995). Este enfoque requiere secuenciación, que no siempre fue práctica, especialmente cuando muchos fitoplasmas desconocidos debían ser analizados, y cuando muchos laboratorios no estaban equipados para la secuenciación de nucleótidos.

El análisis por RFLPs del gen 16S rRNA con un número de enzimas de restricción fueron utilizados por Lee (1993) y por

Schneider (1993) para diferenciar a los fitoplasmas por sus distintos patrones de bandeo. Este procedimiento resultó ser simple, confiable y práctico. Basado en el análisis RFLP (con 15-18 enzimas de restricción) de 16S rRNA amplificado a partir de cepas de fitoplasmas representativas asociadas con numerosas enfermedades.

Lee et al. (1993) Propusieron un sistema de clasificación que comprendía 10 grupos principales de fitoplasmas (denominados grupos 16S rRNA) y 15 subgrupos. El esquema se amplió posteriormente a 14 grupos y 38 subgrupos (Lee *et al.*, 1994). Los grupos 16S rRNA de fitoplasmas identificados por análisis de RFLP son coherentes con los subgrupos de fitoplasmas basados en estudios filogenéticos (Gundersen *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1994). El esquema de clasificación global, combinado con el patrón característico de RFLP de cada grupo y subgrupo, continúa proporcionando un medio simple, fiable y práctico para identificar fitoplasmas desconocidos sin la necesidad de secuenciar el gen 16S rRNA. Es así como Seemüller y colaboradores (1998), propusieron 20 subgrupos distintos de fitoplasmas derivados del análisis filogenético de secuencias del gen 16S rRNA de 57 cepas de fitoplasmas.

Posición filogenética de los Fitoplasmas.

Durante más de tres décadas, desde el descubrimiento de estos patógenos vegetales únicos, los intentos de cultivar fitoplasmas en medios bacteriológicos han fallado. Esta incapacidad ha hecho difícil determinar el estatus taxonómico de los fitoplasmas por los métodos tradicionales aplicados a los procariontes cultivados. A pesar de su parecido con los micoplasmas de animales o humanos en

morfología y ultraestructura, por mucho tiempo permaneció de forma incierta si los fitoplasmas eran miembros de la clase Mollicutes (Lee *et al.*, 2000).

En los años 80, se desarrolló un procedimiento innovador que permitió estudios de la filogenia de procariontes mediante análisis de secuencias del gen rRNA altamente conservadas (Woese *et al.*, 1980; Woese, 1987; Weisburg *et al.*, 1989). Estos trabajos sugirieron que los mollicutes heterogéneos derivaban de un solo linaje de bacterias gram-positivas ancestrales. Con la comparación de secuencias de genes 16S rRNA entre los miembros de la clase mollicutes y varios procariontes, marcaron que estos surgieron de un ancestro bacteriano gram-positivo parecido a *Clostridium* del linaje de lactobacillus, cuyo genoma tiene un bajo contenido de guanina-citosina (G + C) (Weisburg *et al.*, 1989). Se identificaron cuatro grupos filogenéticos principales: *Mycoplasma hominis*, *M. pneumoniae*, *Spiroplasma* y *Anaeroplasma*. El clado *Anaeroplasma* se divide en dos órdenes: *Anaeroplasmatales* y *Acholeplasmatales* (Weisburg *et al.*, 1989).

Las investigaciones filogenéticas de los Organismos similares a Micoplasmas (MLOs por sus siglas en inglés) comenzaron a finales de los años 80. Se compararon las secuencias de genes 16S rRNA de un MLO (*Oenothera virescence* Phytoplasma) perteneciente al grupo aster yellows con *Acholeplasma laidlawii* y un micoplasma animal (Lim y Sears, 1989); sus hallazgos revelaron que el MLO fitopatogénico era un miembro de la clase mollicutes y que el MLO estaba más estrechamente relacionado con *Acholeplasma* que con el micoplasma animal. Los estudios posteriores que analizaron secuencias de varias proteínas

ribosómicas confirmaron la estrecha relación filogenética entre este MLO y *Acholeplasma* (Lim y Sears, 1991; Lim y Sears, 1992; Sears y Kirkpatrick, 1994; Toth et al., 1994). Estos descubrimientos inspiraron investigaciones adicionales sobre las relaciones filogenéticas de varios MLOs (Kuske y Kirkpatrick, 1992; Namba et al., 1993; Griffiths et al., 1994; Kirkpatrick et al., 1994a; Seemuller et al., 1994).

Los análisis filogenéticos globales de las secuencias de 16S rRNA y operón del gen Rp mostraron que los fitoplasmas formaban un gran clado monofilético discreto dentro del clado de *Anaeroplasma* (Kuske y Kirkpatrick, 1992; Namba et al., 1993; Griffiths et al., 1994; Kirkpatrick et al., 1994a; Seemuller et al., 1994). El clado de fitoplasma es parafilético para las especies de *Acholeplasma*, siendo este junto con *A. modicum* los parientes más cercanos conocidos de los fitoplasmas. Dentro del clado de fitoplasma, se identificaron inicialmente 11 subclados distintos (grupos monofiléticos o taxones): los Aster yellows, Apple proliferation, peanut witches broom, peach X-disease, rice yellow dwarf, pigeon pea witches'-broom, palm lethal yellowing, ash yellows, clover proliferation, elm yellows y los subclados de witches broom. En los últimos 5 años se han reconocido 20 subclados (Seemüller et al., 1998). Las filogenias han formado una base para la clasificación de este grupo de patógenos de plantas. Los subgrupos filogenéticos coinciden con grupos de 16S rRNA *Phytoplasma* identificados por sus patrones RFLP, validando los esquemas de clasificación que se basan en el análisis RFLP de secuencias de 16S rRNA (Lee et al., 1994).

Sistema taxonómico provisional para fitoplasmas.

Las investigaciones filogenéticas de los fitoplasmas, condujeron a la propuesta de que el clado de estos organismos se distinguiera a nivel de taxonómico de un género, y que cada subclado (o grupo correspondiente de 16S rRNA) debería al menos representar una especie distinta (Gundersen *et al.*, 1994). La designación de nuevas especies en la clase mollicutes requiere descripciones de las especies en cultivo puro, pero los fitoplasmas no pueden ser aislados en cultivo, y las características fenotípicas utilizadas para describir las especies de mollicutes son inalcanzables para los fitoplasmas no cultivados. Por lo tanto, se ha adoptado un sistema de clasificación provisional utilizando la categoría de "*Candidatus*" para los fitoplasmas (Lee *et al.*, 2000).

La entidad taxonómica básica (una especie bacteriana, según lo recomendado y definido por el Comité Internacional de Bacteriología Sistemática) incluye cepas con al menos 70% de homología de ADN (70% -85% de homología para las cepas dentro de una subespecie), basado en una secuencia completa del genoma bacteriano y un temperatura de fusión o punto medio (ΔT_m) ≤ 5 °C (Wayne, 1987; Vandamme *et al.*, 1996; Razin, 1998). Las especies de fitoplasma no han sido delineadas por este enfoque porque nunca se ha intentado valoraciones de homología de ADN para los fitoplasma. El término provisional de *Candidatus* Phytoplasma sp, se ha definido arbitrariamente basándose en las secuencias del gen 16S rRNA de acuerdo con los conceptos de articulados de Murray y Schleifer (1994). Debido a la naturaleza altamente conservada de las secuencias del gen 16S rRNA, no hay un umbral definido de homología de secuencia para asignar un

rango de especie. Aunque hubo consenso en la designación de especies de *Candidatus* Phytoplasma como una unidad taxonómica temporal, no se ha alcanzado consenso para asignar un rango taxonómico apropiado para los subgrupos 16S de rRNA identificados por patrones de RFLP de 16S rRNA. En parte, esto se debe a la incapacidad de satisfacer muchos subgrupos fácilmente por el análisis filogenético de las secuencias del gen 16S rRNA. Las similitudes de las secuencias del gen 16S rRNA entre los miembros del subgrupos miembros de un determinado fitoplasma van desde 95% a > 99%, mientras que las similitudes entre dos grupos de 16S rRNA van desde 88% a 94% (Lee *et al.*, 1994). Sin embargo, hay ejemplos de cepas bacterianas que se clasifican fácilmente como especies distintas por métodos convencionales (por ejemplo, homología de ADN y caracteres fenotípicos), que no pueden distinguirse por el análisis de sus secuencias de 16S rRNA, ya que algunos de ellos comparten 99% o más de similitud en sus secuencias de 16S rRNA (Ash *et al.*, 1991; Stackebrandt y Goebel, 1994; Fraser *et al.*, 1995).

En el mapa genómico comparativo de dos fitoplasmas estrechamente relacionados de Australia que comparten 98% en similitud de la secuencia 16S rRNA, los de potato little leaf y tomato big bud (Padovan y Gibb, 1998), se observaron importantes variaciones genéticas que no se revelaron mediante el análisis de la secuencia ribosómica. Recientemente, Stackebrandt y Goebel (1994) señalan que basándose en las secuencias de genes 16S del rRNA disponibles hasta la fecha, las bacterias que comparten la homología de la secuencia del 16S rRNA < 97%, no producirán una re-asociación total del ADN genómico de > 60%, independientemente de los métodos de hibridación ADN-ADN utilizados.

Este hallazgo sugiere un método potencial para definir una especie bacteriana que se basa en la similitud de la secuencia del 16S rRNA, reemplazando los complicados métodos de hibridación ADN-ADN usados para estimar la homología del ADN de los genomas bacterianos. Basándose en estos criterios, cada grupo de 16S rRNA de fitoplasma, y algunos subgrupos de 16S rRNA podría asignarse el estatus de taxa a nivel de especie. Las filas taxonómicas de muchos miembros de subgrupos que comparten $\geq 97\%$ de similitudes son inciertas y aún no se han determinado (Lee *et al.*, 2000).

Se han utilizado marcadores filogenéticos adicionales tales como genes *rp*, el gen *tuf*, gen 23S rRNA y las secuencias espaciadoras intergénicas 16S/23S rRNA, como herramientas suplementarias para la diferenciación de fitoplasmas (Kirkpatrick *et al.*, 1994b; Lee *et al.*, 1994; Gundersen *et al.*, 1996; Smart *et al.*, 1996; Schneider *et al.*, 1997; Guo *et al.*, 1998). Las delineaciones de subgrupos casi congruentes construidas usando estos marcadores filogenéticos, apoyan aún más la noción de que existen niveles significativos de heterogeneidad genética, entre miembros de algunos grupos diversos de fitoplasmas, en particular el grupo de aster yellows. La delineación del grupo de fitoplasma utilizando estos marcadores, ha sido consistente con la deducción por el análisis del gen 16S rRNA. Sin embargo, el número de subgrupos resueltos por cada marcador es ligeramente diferente. Los genes *rp* han revelado más variaciones entre los miembros de un grupo dado y resuelto las diferencias entre más subgrupos distintos que tienen 16S rRNA y otros genes (Lee *et al.*, 2000). Lee (1994) y Gundersen (1996) observaron que la delineación de subgrupos más finos dentro de los grupos aster yellows (16Srl) y X-disease (16SrlIII) podría lograrse

combinando análisis de RFLP de secuencias de 16S rRNA y rp. Los subgrupos reconocidos por estos métodos fueron consistentes con los subclusters identificados por el análisis de genomas de fitoplasma a través de hibridaciones punto y Southern, utilizando una serie de sondas de ADN de fitoplasma clonado (Lee *et al.*, 2000).

Cuestiones relativas a la delimitación de especies.

Uno de los principales obstáculos que plantean los sistemas de clasificación basados en estudios moleculares, es la falta de un vínculo directo entre un taxón designado y sus características fenotípicas o biológicas. Sin este vínculo se cuestiona la viabilidad de un taxón asignado. Las propiedades fenotípicas son inalcanzables para los fitoplasmas no cultivados. Sin embargo, las propiedades biológicas de la mayoría de los fitoplasmas, pueden determinarse y utilizarse como características complementarias para definir las especies de *Candidatus* Phytoplasma. Aparentemente, la mayoría de los subgrupos designados dentro de un grupo de 16S rRNA dado, representan subclusters distintos de fitoplasmas, que tienen nichos ecológicos únicos (Lee y Davis, 1992; Gundersen *et al.*, 1996). Por ejemplo, Apple proliferation phytoplasma (subgrupo 16rX-A), Pear decline phytoplasma (subgrupo 16SrX-C), Plum leptonecrosis y European Stone fruit phytoplasma (subgrupo 16SrX-B), están asociados con sus huéspedes específicos (plantas y/o insectos vectores), y cada uno induce un conjunto diferente de síntomas característicos en las plantas infectadas. Las infecciones cruzadas mutuas entre varios huéspedes por estos fitoplasmas son raras en huertos en Europa, donde las prácticas de cultivo mixto son comunes. Por lo tanto, es necesario y práctico para identificar el rango de

heterogeneidad genómica entre los miembros de cada subclado de fitoplasma, o el grupo 16S rRNA correspondiente. Debe asignarse un rango taxonómico apropiado a cada subgrupo. Gundersen et al. (1996) Han propuesto que cada subgrupo debe distinguirse al menos en un nivel de subespecies. De hecho, sin un consenso intencional, cada una de las dos nuevas especies de *Candidatus* Phytoplasma, *P. aurantifolia* y *P. Australasia*, pertenecen a un subgrupo distinto dentro del grupo Witches-broom (16SrII), mientras que las especies *Candidatus* Phytoplasma *P. australiense* y *P. japonicum* pertenecen a dos subgrupos separados dentro del grupo de stolbur (16SrXII).

Especificidad de fitoplasmas en los hospedantes.

Los tipos de hospedantes naturales tanto de plantas como de insectos vectores, varían con la cepa del fitoplasma (Music y Skoric, 2013). Experimentalmente, algunos fitoplasmas pueden ser transmitidos por un vector polífago para una amplia gama de plantas huésped. Por ejemplo, los fitoplasmas del aster amarillo (16SrI-A,-B), se transmiten de forma experimental por la chicharrita *Macrosteles fascifrons* y otros vectores polípagos a 191 especies de plantas pertenecientes a 42 familias (McCoy et al., 1989). Sin embargo, parece que la gama de especies de planta que pueden ser infectadas por un fitoplasma dado en la naturaleza, está determinada en gran medida por el número de especies de insectos vectores que son capaces de transmitir el fitoplasma y por los comportamientos de alimentación de estos vectores (monófagos, oligófagos y polípagos) (Bosco y Tedeschi, 2013).

Los fitoplasmas tales como los que transmiten virescencia de la remolacha (BLTV, subgrupo 16SrVI-A), son transferidos por la chicharrita polífaga *Circulifer tenellus* Baker. Los fitoplasmas causantes de los amarillos aster de California (AY, subgrupo 16SrI-B), que se transmiten por numerosos insectos vectores polífagos, son capaces de causar enfermedades en una amplia variedad de especies de plantas; mientras que los fitoplasmas amarillos del olmo americano (subgrupo 16SrV-A), se transmiten por el vector *Scaphoideus luteolus* que puede ser monófago u oligófago, el cual provoca enfermedades en sólo unas pocas especies de plantas, sobre todo en el género *Ulmus* (Lee *et al.*, 2000).

Los fitoplasmas mejoran la “aptitud” del insecto vector.

El hallazgo de que las bacterias cambian drásticamente la expresión génica y producen factores de virulencia específicos para invadir a sus insectos vectores, habla de una coevolución extensa entre insectos y bacterias. La asociación con los insectos parece beneficiosa para las bacterias. Sin embargo, el beneficio para los insectos debe ser considerado también (Orlovskis *et al.*, 2015). De hecho, *Pectobacterium carotovorum* induce la pudrición de la fruta, lo que facilita el ciclo de vida de la mosca de la fruta (Basset *et al.*, 2003). Los hallazgos recientes indican que los patógenos bacterianos utilizan diversas estrategias para promover la atracción y colonización de sus insectos vectores (Orlovskis *et al.*, 2015).

Los patógenos promueven la atracción de los insectos hacia las plantas huéspedes infectadas alterando las señales visuales u olfativas que usan los insectos para localizar una planta huésped adecuada (Orlovskis *et al.*, 2015). Por ejemplo, la producción del sesquiterpeno b-cariofileno en

“*Candidatus Phytoplasma mali*” hacen que las plantas infectadas sean más atractivas para su psílido vector *Cacopsylla picta* (Mayer *et al.*, 2008a, b). Los síntomas del amarillamiento causado por fitoplasmas y liberibacter pueden ser provocados por perturbaciones en la carga de azúcar del floema, la acumulación de almidón y el bloqueo del floema (Martinelli *et al.*, 2013; Wulff *et al.*, 2014).

Una vez que el insecto es atraído a una planta infectada, las bacterias parásitas de éstas pueden utilizar diversos mecanismos para mejorar la alimentación del insecto y la puesta de huevos, promoviendo así la adquisición de patógenos (Orlovskis *et al.*, 2015). La supresión bacteriana de las respuestas de defensa inducidas por herbívoros, posiblemente asociado con el transporte alterado de solutos en el floema o xilema y la calidad nutricional de las plantas, pueden alterar la conducta de alimentación de los insectos (Orlovskis *et al.*, 2015). Se sabe que las proteínas efectoras secretadas por los fitoplasmas, desestabilizan los reguladores transcripcionales conservados, dando lugar a cambios tanto en el desarrollo de la planta como en la defensa contra herbívoros. Se demostró que el factor de virulencia TENGU afecta al desarrollo de la planta, y a la regulación de uxininas que pueden alterar las vías de defensa de la planta (Hoshi *et al.*, 2009; Minato *et al.*, 2014).

Genómica y Mecanismos de Patogenicidad.

Los síntomas causados por fitoplasmas en plantas apuntan a que existe interferencia entre los mecanismos de señalización y metabolismo hormonal vegetal. Estudios fisiológicos han mostrado que los niveles de almidón en las raíces de árboles frutales infectados por fitoplasmas son

reducidos de un tercio, a la mitad de lo normal, y ese almidón y otros hidratos de carbono se acumulan en tejido foliar (Dickinson *et al.*, 2012). Experimentos de marcado radioactivo, han confirmado que el transporte de fotosintatos desde brotes a raíces y de hojas maduras a jóvenes, se deteriora en plantas infectadas por fitoplasmas. Estudios metabólicomicos en la planta de ornato conocida como “teresita” (*Catharanthus roseus* L.), la cual se ha utilizado como modelo experimental para fitoplasmas, han mostrado una acumulación de metabolitos en hojas, relacionados con la biosíntesis de fenilpropanoide, además de la acumulación de sacarosa, glucosa, glicina, polifenoles y ácido succínico (Choi *et al.*, 2004). También se conoce que los niveles de azúcar son importantes en la regulación de la transición floral, y estudios de expresión génica en tomates infectados con el fitoplasma stolbur (que causa virescencia y filodia) han indicado que los genes que controlan la identidad de la inflorescencia del meristemo están sobre expresados, mientras que las que se encargan del desarrollo del meristemo y la identidad de la flor están disminuidos (Pracros *et al.*, 2006).

Para conocer más sobre los mecanismos de patogenicidad de los fitoplasmas, se han desarrollado numerosos proyectos de investigación, encaminados a la secuenciación del genoma, así como estudios de los genes implicados en los mecanismos, y de la identidad de las causas que generan los cambios en el desarrollo de la planta. Estos proyectos, han incluido tanto el aislamiento del ADN de plantas como el de los insectos infectados, el mapeo cromosómico y el aislamiento de plásmidos (Dickinson y Hodgetts, 2012).

A la fecha, cuatro genomas de fitoplasmas han sido completamente secuenciados, uno es el de la cepa de “escoba de bruja” (AY-WB) del 16Sr I-A “*Ca. Phytoplasma asteris*”, (Bai, 2004), otro el de la cepa del amarillamiento de la cebolla (OY) del 16Sr I-B “*Ca. Phytoplasma asteris*” (Oshima *et al.*, 2004), el del 16SrXII-B “*Ca. Phytoplasma australiense*” (Tran-Nguyen *et al.*, 2008), y uno más, el del 16SrX-A “*Ca. Phytoplasma mali*” (Kube *et al.*, 2008).

“*Ca. Phytoplasma mali*” a diferencia de otros mollicutes estudiados hasta el momento, tiene un cromosoma lineal (Kube *et al.*, 2008). Dos de los fitoplasmas “aster yellows” poseen de 2-4 plásmidos que codifican 754 y 671 genes respectivamente, de los cuales un 60% tienen función. El genoma de “*Ca. Phytoplasma australiense*” también es circular, codifica 839 genes y tiene un solo plásmido, mientras que el fitoplasma “*Ca. Phytoplasma mali*” no contiene plásmido alguno y codifica 497 genes (Dickinson *et al.*, 2012).

Análisis de las secuencias del genoma revelan que estos cuatro genomas de fitoplasmas carecen de genes para procesos metabólicos esenciales. Esto incluye vías para la biosíntesis de muchos aminoácidos, ácidos grasos y nucleótidos; lo que sugiere que los fitoplasmas deben de importar estas moléculas de sus anfitriones (Kube *et al.*, 2008; Tran-Nguyen *et al.*, 2008).

Adicionalmente, pese a que vive en altos medios de azúcar (1 molar de sacarosa en el floema y 0.9 molar de trehalosa en el insecto) los fitoplasmas carecen de genes para el

sistema de fosfotransferasa, que muchas otras bacterias usan como medio de importación de energía para la fosforilación de azúcares, sucrosa, glucosa y fructuosa. El patrón de señalización glicolítico puede ser que produzca un desbalance en la distribución de azúcares en la planta asignados a los síntomas de enfermedades (Christensen *et al.*, 2005). Los fitoplasmas tienen un patrón incompleto para el metabolismo de los carbohidratos y la producción de ATPs. El genoma de “*Ca. Phytoplasma asteris*” fue el primer organismo identificado que no tiene genes que sintetizan ATP (Oshima *et al.*, 2004), esto sugiere que los fitoplasmas son muy importantes en el sentido de que generan ATP, a partir de un sistema desconocido (Tran-Nguyen *et al.*, 2008). El tamaño pequeño del genoma y la tendencia aparente a la reducción evolutiva de los fitoplasmas, sugiere un nivel sorprendentemente alto de las repeticiones dentro de los genomas del fitoplasma. Se ha encontrado que varios genes tienen múltiples copias, por ejemplo ‘*Ca. Phytoplasma australiense*’ tiene dos copias completas del sistema de transporte ABC para péptidos y níquel (Tran-Nguyen *et al.*, 2008).

Por otra parte, los genes multicopia, están asociados a menudo con otro fenómeno de los genomas de los fitoplasmas, son las llamadas unidades móviles potenciales (PMUs). Algunas PMUs no contienen todos los elementos necesarios para ser verdaderamente móviles, pero sí incluyen genes con función de recombinación de ADN, dado que poseen una transposasa y están flanqueados por repeticiones invertidas (Dickinson, 2010).

Dentro de los genomas del fitoplasma las PMUs tienden a agruparse, y probablemente la PMUs mejor caracterizada

es PMU1 del fitoplasma de la cepa “escoba de bruja” del áster amarillo (AY-WB por sus siglas en inglés) que se encontró existente en dos formas dentro de este: PMU1 circular, extracromosómica (nombrada C-PMU1), y la otra, una forma lineal e integrada (L-PMU1) (Toruno *et al.*, 2010), curiosamente, los niveles de C-PMU1 son más altos en células de insecto infectantes de fitoplasma que los aislados de plantas, y este aumento de C-PMU1 en las células de insectos sugiere que este proceso ayuda a adaptar a los fitoplasmas a su entorno (Toruno *et al.*, 2010), la adaptación a nuevos ambientes proporciona una explicación atractiva de por qué un organismo tan pequeño contiene múltiples repeticiones de genes (Dickinson *et al.*, 2012).

A nivel celular, las células tienen la capacidad de secretar sustancias al exterior de ellas, es decir, al medio extracelular. Estas sustancias en su mayoría son proteínas que cumplen diversas funciones, tales como hormonas, enzimas, proteínas señaladoras, entre otras. Los sistemas de secreción en la relación parásito-hospedero, se secretan diversas proteínas (efectores) que juegan el papel de defensa (del hospedero) como de ataque o invasión (del parásito). En este mecanismo biológico, existen diversos tipos de sistemas de secreción según el tipo de interacción y respuesta.

Se sabe que muchas bacterias fitopatógenas usan sistemas de secreción de Tipo III y IV para bombear efectores y factores de patogenicidad en células vegetales. Aunque los fitoplasmas carecen de estos sistemas de secreción, tienen sistemas de secreción dependientes de Sec, y basado en secuenciación del genoma, se han identificado secuencias de proteínas que portan péptidos dirigiéndolos a la

secreción. Se postula que los fitoplasmas segregan estos pequeños péptidos en el floema, y que son capaces de migrar a otras células vegetales para afectar la expresión génica. Varios de estos genes recientemente se han expresado en plantas transgénicas y se ha demostrado que actúan como proteínas efectoras, interfiriendo con factores de transcripción en las plantas huésped para dar lugar a síntomas clásicos de fitoplasma tales como virescencia, escoba de bruja y enanismos (Lough y Lucas, 2006; MacLean *et al.*, 2011). También se ha postulado que la metilación epigenética del ADN vegetal puede estar implicada en la regulación específica de ciertos genes del desarrollo floral (Pracros *et al.*, 2006).

Transferencia horizontal de genes: un atajo para la virulencia.

Los genomas de fitoplasma albergan muchas secuencias repetidas que se organizan en grupos parecidos a transposones, este grupo de secuencias son llamados unidades móviles potenciales (PMUs) (Bai *et al.*, 2006). Los PMUs tienen un tamaño de ~20 kb y contienen genes para factores de transcripción especializados (*sigF*), replicación de ADN (*dnaB*, *dnaG*), síntesis de ADN (*tmk*), recombinación de ADN (*ssb*, *himA*), proteínas dirigidas a la membrana y *tra5* que es un secuencia de inserción de la familia IS3 que codifica una transposasa de fusión de ORFAB de longitud completa (Bai *et al.*, 2006). Genomas de fitoplasmas tienen muchas copias de PMU y agrupaciones tipo PMU (Oshima *et al.*, 2004; Jomantiene *et al.*, 2007), estas últimas parecen ser versiones degeneradas de PMU (Bai *et al.*, 2006). PMU y agrupaciones tipo PMU son frecuentes en ~500 kb en los cromosomas de fitoplasma pero completamente ausentes de ~250 kb de

regiones cromosómicas que albergan predominantemente genes importantes con funciones metabólicas en los fitoplasmas (Bai *et al.*, 2006). Un PMU, denominado PMU1, en el genoma de la cepa de Aster Yellow (AY-WB) contiene versiones completas de todos los genes con funciones conocidas, y también están flanqueados por repeticiones invertidas de 328 pb corriente arriba de *sigB* (primer gen de PMU1) y corriente abajo de *tra5* (último gen de PMU1) (Bai *et al.*, 2006).

Los fitoplasmas pueden tener de dos a cuatro plásmidos que varían en tamaño (Nishigawa *et al.*, 2002; Liefing *et al.*, 2004; Bai *et al.*, 2006). Los plásmidos contienen genes para replicarse (Rep) similares a los encontrados en geminivirus (virus de planta) y circovirus (virus de animales) (Oshima *et al.*, 2001). Se predice que muchos de los genes del plásmido codifican proteínas secretadas y varios mutantes espontáneos de OY-M no son transmisibles por insectos (Oshima *et al.*, 2001) y carecía de varios genes plasmídicos (Nishigawa *et al.*, 2002), sugiriendo una relación entre los plásmidos y la transmisibilidad del fitoplasma al insecto (Nishigawa *et al.*, 2002).

Transmisión.

La transmisión de fitoplasmas entre las plantas, es mediante la alimentación del floema por insectos del orden Hemiptera, actualmente este orden está dividido en 3 Subórdenes: Heteróptera (chinches verdaderas), Sternorrhyncha (áfidos, mosquita blanca, psílicos e insectos escamas) y Auchenorrhyncha (chicharritas) (Weintraub y Beanland, 2006); sin embargo, todavía hay muchos fitoplasmas para los cuales el vector (s) no ha sido

confirmado, mientras que otros pueden ser vectorizados por muchas especies. La adquisición inicial de fitoplasma ocurre durante la alimentación, y luego se produce un periodo de en el que el insecto vector no es capaz de transmitir el fitoplasma, conocido como el periodo latente. Para que el vector se infecte, los fitoplasmas deben pasar a través del intestino medio y la membrana basal que entra en el homocele del intestino (Dickinson y Hodgetts, 2012).

Los fitoplasmas pueden moverse a través de la hemolinfa e infectar varias partes del insecto, aunque es la penetración de las glándulas salivales lo que permite la transmisión. Aquí el fitoplasma se reproducirá y alcanzara un alto título que permitirá la transmisión durante la alimentación del insecto (Weintraub y Beanland, 2006; Hogenhout y Loria, 2008). Uno de las otros organos del vector que el fitoplasma puede infectar, son los tejidos reproductores de estos insectos, y se ha demostrado que es posible la transmisión transovarial de fitoplasmas a la progenie. Hay algunos casos en los que se ha informado que la presencia de fitoplasmas en el insecto reduce la aptitud del vector (Kirkpatrick *et al.*, 1994a) y también ejemplos en los que se ha demostrado que aumenta la fecundidad y la longevidad del vector de insectos (Beanland *et al.*, 2000).

Se ha encontrado que *Catharanthus roseus* (L.), comúnmente conocido como el bígaro de Madagascar, vinca, o teresita, es muy susceptible a las infecciones por fitoplasma. Las razones de esto siguen siendo desconocidas. Debido a esto se ha utilizado como huésped experimental y para el mantenimiento de colecciones de fitoplasmas con fines de investigación (Seemüller *et al.*, 1998; Favali *et al.*, 2004). Los bígaros son una planta

tropical perenne perteneciente a la familia Apocynaceae que se distribuye en todo el mundo y ampliamente cultivada (McCann y Guttman, 2008). *Catharanthus roseus* es una planta siempre verde con atractivo follaje brillante oscuro y flores de color, lo que significa que es comúnmente cultivada en jardines y ha sido utilizada como planta ornamental (McCann y Guttman, 2008).

Sin embargo, también tiene usos como planta medicinal debido al descubrimiento durante la década de 1960 de que los extractos de hojas tenían un efecto antitumoral en ratas (Dickinson y Hodgetts, 2012). Esto se debe a la producción de numerosos alcaloides indol de monoterpenoides, dos de los cuales (vinblastina y vincristina) son ahora importantes fármacos comerciales para la terapia del cáncer (Liu *et al.*, 2004; Dodds *et al.*, 2006). Curiosamente, los estudios han indicado un aumento significativo de vinblastina en las raíces de *Catharanthus roseus* infectados con fitoplasma en comparación con plantas sanas.

La transmisión por insectos es, con diferencia, la forma más importante de propagación del fitoplasma en condiciones naturales y de campo. Sólo las especies seleccionadas pueden actuar como vectores y la transmisión de fitoplasmas por los insectos ciertamente implica, a varios niveles, elementos de especificidad huésped-patógeno. Los insectos vectores pueden ser polífogos, oligófagos o estrictamente monófagos, de acuerdo con su capacidad para alimentarse y reproducirse en muchas, pocas o una planta huésped, respectivamente (Dickinson y Hodgetts, 2012). De forma general los fitoplasmas pueden ser generalistas, infectar varias especies de plantas diferentes, o especialistas, infectando una o algunas especies

vegetales relacionadas. Como consecuencia, un fitoplasma generalista puede ser transmitido por varias especies de vectores. Los fitoplasmas de plantas especializadas pueden ser transmitidos por una estrecha gama de especies de vectores o por un vector específico (Ma *et al.*, 2006).

Cuando se seleccionan los vectores de fitoplasma, los ensayos de PCR de insectos colectados en campo, pueden proporcionar indicaciones sobre el posible papel de una especie como vector de fitoplasmas. Aunque Weintraub y Beanland (2006), han incluido cerca de 100 especies de insectos vectores de fitoplasmas. Muchos vectores de fitoplasmas aún no se han descubierto y el papel en la propagación de enfermedades económicamente importantes, ha sido descuidado. Después de que el vector adquiere al fitoplasma por medio de la planta infectada, hay un periodo latente antes de que el vector pueda transmitir al fitoplasma, por lo que los ensayos de transmisión consisten en tres etapas fundamentales: adquisición, latencia e inoculación. Durante la fase de adquisición, el insecto-vector ingiere células de fitoplasma a través de la alimentación en una planta infectada (Weintraub y Jones, 2010).

La adquisición puede ser "natural", cuando los insectos recolectados en campo, infectados naturalmente, se utilizan en ensayos de transmisión, o "controlados" cuando los vectores putativos sanos, están enjaulados alimentándose de las plantas infectadas. En este último caso, el periodo de tiempo dado a los insectos para adquirir el citoplasma se denomina periodo de acceso a la adquisición (AAP). Por lo general, el AAP dura de unos pocos a varios días para asegurar una alta eficiencia de adquisición. Incluso unas

pocas horas son suficientes para que algunas especies adquieran un fitoplasma (Stavrínides *et al.*, 2006; Win *et al.*, 2007). Cuando se desconoce el AAP óptimo, los tiempos de adquisición largos deben proporcionar la máxima eficiencia. El período de latencia (LP), también llamado "período de incubación", es el intervalo de tiempo entre la adquisición y el inicio de la infectividad. Durante esta fase, los fitoplasmas invaden el cuerpo del insecto a través de la hemolinfa, se multiplican y alcanzan las glándulas salivales. El LP varía de 12 días a más de un mes dependiendo de la especie de insecto, cepa/especie de fitoplasma y factores abióticos tales como temperatura (Marzachi *et al.*, 2004a).

Técnicas para el mantenimiento y propagación de fitoplasmas en *Catharanthus roseus*.

Dada la susceptibilidad del bígaro de Madagascar a los fitoplasmas, este se ha convertido en un modelo biológico para estudios bioquímicos, moleculares y además, como reservorio natural, funcionando así como ceparios de fitoplasmas.

Los síntomas causados por fitoplasmas en las plantas hospederas (incluyendo *C. roseus*) pueden incluir, aunque no se limiten a virescencia (los pétalos toman color verde), filodia (desarrollo de partes floreales en estructuras parecidas a hojas), esterilidad, elongación y etiolación de los entrenudos, formación de rayas y malformación de las flores, amarillamiento y postura erguida de las hojas, ramificaciones excesivas de brotes axilares, escoba de brujas (proliferación de brotes de un solo punto, típicamente en plantas leñosas), el atrofiar general, el enrollamiento de la hoja o el balanceo, flores pequeñas y débilmente coloreadas.

El conjunto de síntomas en las plantas infectadas puede variar dependiendo del fitoplasma en cuestión, de las especies de plantas huésped, de la edad de la planta en la infección y del estadio de infección. Por ejemplo, dentro del grupo Aster yellows (*Candidatus Phytoplasma asteris*), diferentes subgrupos producen distintos subconjuntos distintos de síntomas y cepas leves no pueden inducir síntomas obvios. Sin embargo, generalmente los síntomas son perjudiciales para el huésped de la planta (Choi *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2004) La mayoría de los fitoplasmas pueden transmitirse a *Catharanthus roseus* por medio de injerto, por transmisión de *Cuscuta* spp, o la transmisión por insectos vectores.

Técnicas de transmisión de fitoplasmas por insectos vectores.

Los fitoplasmas son patógenos limitados al floema asociados con muchas enfermedades tanto en plantas cultivadas como silvestres. En la naturaleza, los fitoplasmas son transmitidos por insectos vectores de forma persistente y propagativa. Los insectos adquieren los fitoplasmas alimentándose de una planta infectada y luego los transmiten a una planta sana después de un periodo latente, durante el cual los fitoplasmas se mueven y se multiplican en el cuerpo del vector. Los insectos a menudo permanecen infecciosos toda su vida. Dado que los fitoplasmas están limitados por el floema, sus vectores, pertenecientes al orden Hemiptera, son alimentados del floema. La transmisión por insectos es, con diferencia, la forma más importante de propagación del fitoplasma en condiciones naturales y de campo. Sólo las especies seleccionadas pueden actuar como vectores y la transmisión de fitoplasmas por los insectos ciertamente implica, a varios

niveles, elementos de especificidad huésped-patógeno. Los insectos vectoriales pueden ser polífagos, oligófagos o estrictamente monófagos de acuerdo con su capacidad para alimentarse y reproducirse en muchas, pocas o una planta huésped, respectivamente. De forma general los fitoplasmas pueden ser generalistas, infectar varias especies de plantas diferentes, o especialistas, infectando una o algunas especies vegetales relacionadas. Como consecuencia, un fitoplasma generalista puede ser transmitido por varias especies de vectores. Los fitoplasmas de plantas especializadas pueden ser transmitidos por una estrecha gama de especies de vectores o por un vector específico (Bosco y Tedeschi, 2013).

Cuando se seleccionan los vectores de fitoplasma, los ensayos de PCR de insectos recogidos en el campo pueden proporcionar indicaciones sobre el posible papel de una especie dada en los fitoplasmas transmisores. Aunque Weintraub y Beanland (2006) han incluido cerca de 100 especies de fitoplasmas vectoriales, muchos vectores de enfermedades del fitoplasma aún no se han descubierto y su papel en la propagación de enfermedades económicamente importantes ha sido descuidado. Después de que el vector adquiere al fitoplasma por medio de la planta infectada, hay un periodo latente antes de que el vector pueda transmitir al fitoplasma, por lo que los ensayos de transmisión consisten en tres etapas fundamentales: adquisición, latencia e inoculación. Durante la fase de adquisición, el insecto-vector ingiere células de fitoplasma a través de la alimentación en una planta infectada. La adquisición puede ser "natural", cuando los insectos recolectados en el campo, infectados naturalmente, se utilizan en ensayos de transmisión, o "controlados" cuando los vectores putativos sanos están enjaulados en las plantas

infectadas. En este último caso, el periodo de tiempo dado a los insectos para adquirir el citoplasma se denomina Periodo de Acceso a la Adquisición (AAP). Por lo general, el AAP dura de unos pocos a varios días para asegurar una alta eficiencia de adquisición. Incluso unas pocas horas son suficientes para que algunas especies adquieran un fitoplasma (Golino *et al.*, 1989; Carraro *et al.*, 1997), cuando se desconoce el AAP óptimo, los tiempos de adquisición largos deben proporcionar la máxima eficiencia. El periodo de latencia (LP), también llamado "período de incubación", es el intervalo de tiempo entre la adquisición y el inicio de la infectividad. Durante esta fase, los fitoplasmas invaden el cuerpo del insecto a través de la hemolinfa, se multiplican y alcanzan las glándulas salivales. El LP varía de 12 días a más de un mes dependiendo de la especie de insecto, cepa / especie de fitoplasma y factores abióticos tales como temperatura (Marzachi *et al.*, 2004b).

Durante esta fase, los insectos deben ser criados en una planta adecuada para asegurar la mayor tasa de supervivencia. Una vez que el LP se completa, los insectos inyectan los fitoplasmas directamente en los tubos de tamiz de una planta sana. Por lo tanto, los vectores putativos deben aislarse, individualmente o en lotes, en plantas sanas para evaluar la transmisión de fitoplasma. El periodo de tiempo dado al vector putativo para transmitir el citoplasma se llama periodo de acceso a la inoculación (IAP). Unas pocas horas pueden ser suficientes para transmitir al patógeno, pero los tiempos más largos pueden proporcionar una mayor eficacia de la transmisión.

Basado en los procedimientos anteriores se puede distinguir dos tipos de transmisiones: transmisión controlada (en los

cuales todas las etapas se llevan a cabo bajo condiciones controladas en cámaras climáticas o invernaderos), y transmisión con insectos recogidos en campo (en los que sólo la etapa de inoculación se lleva a cabo bajo condiciones controladas). A continuación, se detallan técnicas para experimentos de transmisión controlada con insectos-vectores, de poblaciones silvestres de *Circulifer tenellus*, capturadas en maleza.

Materiales y Métodos.

Preparación y recolecta de material biológico

Como se mencionó, para el mantenimiento de cepas de fitoplasmas se utilizó a *Catharanthus roseus*, como organismo modelo vegetal (Figura 1), por su ya mencionada susceptibilidad a las infecciones causadas por fitoplasmas.

Por ello se cosecharon semillas de *Catharanthus roseus* provenientes de plantas sanas. Se dejaron germinar en charolas de germinación con sustrato estéril y en cámaras bioclimáticas con un período de 16h luz y 8h obscuridad y 20°C constante. Después de tres semanas, las plántulas fueron trasplantadas a macetas de 15 cm de diámetro, igualmente con sustrato estéril.



Figura 1. Plántulas de *Catharanthus roseus* cultivadas en los invernaderos del INIFAP-Zacatecas.

Por otra parte, se realizó la colecta de insectos en campo para utilizarlos como posibles vectores de fitoplasmas a *C. roseus*. La captura de insectos se realizó durante los meses de agosto de 2016 a junio del 2017 en el Campo Experimental Zacatecas del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP-Zacatecas). Los sitios de muestreo fueron principalmente la maleza cercana a lotes de chiles. Para la captura de los insectos se utilizó la técnica de red de golpeo, en la cual se utilizó una red entomológica, y lo que se hace es golpear o rozar la maleza varias veces, lo que mueve a los insectos haciendo que vuelen o caigan en la red. En este caso, se dieron 100 golpes de red. Los muestreos se llevaron a cabo dos veces por semana (Figura 2).



Figura 2. Bolsas con las recolectas de insectos muestreados en maleza.

Los materiales para la captura en campo de chicharritas que se utilizaron son una red entomológica y bolsas de plástico. Una vez colectados, se necesita separar las chicharritas de la especie *C. tenellus*, con lo cual los materiales son un extractor de insectos, y cajas de Petri de plástico (Figura 3).



Figura 3. Materiales de captura para chicharritas: Cajas Petri, pipeta pasteur y manguera de plástico para elaborar el extractor de insectos.

Los insectos recolectados se trasladaron el mismo día al laboratorio de entomología del INIFAP-Zacatecas, con la finalidad de hacer la identificación, conteo y sexado de los insectos de *C. tenellus* (Figura 4) y ser resguardadas en cajas petri de plástico.



Figura 4. *Circulifer tenellus* Baker vector de fitoplasmas.

Infestación sistémica

Las plantas de *C. roseus* de dos meses de edad, se les colocó en la base del tallo, una tapa hecha de cartoncillo blanco para la recuperación posterior de los insectos (Figura 5), ya que estos se analizaron por PCR para la presencia de fitoplasmas.



Figura 5. *Catharanthus roseus* preparadas con una tapa de cartoncillo, listas para ser infestadas.

Un número de entre cinco y ocho chicharritas de la especie *C. tenelus*, fueron puestas en cada maceta por un lapso de 48 horas, para provocar la infestación por alimentación.

Las macetas se cubrieron con una bolsa de plástico para evitar alguna interacción con otro insecto que pudiera transmitir otro fitopatógeno que no fuera un fitoplasma (Figura 6).



Figura 6. Plantas de *Catharanthus roseus* infestadas con *Circullifer tenellus* y cubiertas con bolsas.

Periodo de incubación

Posteriormente las plantas se desarrollaron en cámaras bioclimáticas a una temperatura de 24°C constante y con un ciclo de luz de 14 horas luz/10 horas oscuridad, por un periodo de 40 días.

Las plantas fueron regadas cada tercer día y observadas para registrar los cambios que vegetativamente se fueran presentando.

Resultados

Aparición de síntomas

Después de aproximadamente 40 días, se comenzaron a ver las primeras sintomatologías de fitoplasmas presentes en las plantas de *C. roseus* como fueron, virescencia, filodia, amarillamientos y elongación de entrenudos principalmente (Figuras 7 y 8).



Figura 7. Estructuras florales de *Catharanthus roseus* mostrando sintomatología de fitoplasmas después del proceso de infestación inducida con el vector *Circulifer tenellus*,



Figura 8. Se observa la sintomatología típica de fitoplasmas conocida como virescencia.

Detección molecular de fitoplasmas plantas e Insectos.

Para determinar la ausencia o presencia de fitoplasmas en *Catharanthus roseus*, se tomaron una muestras foliares tanto de plantas sintomáticas, como asintomáticas para realizar extracción de ADN total, mediante el protocolo propuesto por Dellaporta (1983). Para la detección de la presencia de fitoplasmas en insectos capturados cinco días después de la infestación, se utilizó el método propuesto por Ceñis para extracción de ADN. Con los extractos de ADN tanto de plantas como de insectos, se realizó la amplificación del gen 16S rRNA de fitoplasmas, con los oligonucleótidos universales P1/Tint para el PCR directo y R16F2n/R16R2 para la PCR anidada.

PCR Directa

5' – AAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG GAT T-3' (P1)

5' – TCA GGC GTG TGC TCT AAC CAG C-3' (Tint)

PCR Anidada

5'-TGACGGGCGGTGTGTACAAACCCCG-3' (R16R2)

5'- GAA ACG ACT GCT AAG ACT GG-3' (R16F2n).

Los resultados del diagnóstico molecular se muestran en la Figura 9, en donde se aprecia la amplificación de la banda de 1.25 kb indicando con ella la presencia de fitoplasmas.

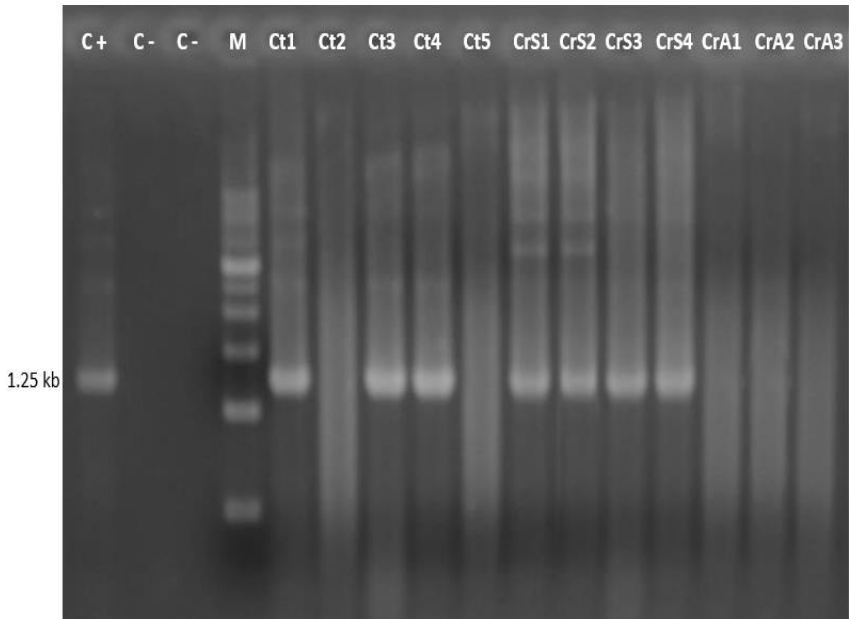


Figura 9. Diagnóstico molecular de la presencia de fitoplasmas con una banda de 1.25 kb, en donde C+ (control positivo), C- (controles negativos), M (marcador molecular 1 kb plus invitrogen), Ct (muestras del 1 al 5 de insectos de *Circulifer tenellus* capturados después de la infección), CrS (muestras del 1 al 4 de plantas de *Catharanthus roseus* con Síntomas de fitoplasmas) y CrA (muestras del 1 al 3 de plantas de *Catharanthus roseus* Asíntomaticas).

Propagación por Injertos

Una vez desarrollado los síntomas en las plantas de *C. roseus*, estas llegan a fenecer en un lapso de tres meses, por lo que la planta al morir, lo hace igualmente los fitoplasmas. Con el objetivo de mantener una cepa viva de fitoplasmas, fue necesario sacar implantes de ramas con la sintomatología bien definida, para propagarlos por medio de injertos a plantas sanas. Estas últimas, sirvieron de portainjerto.

Para tal fin, se utilizaron plantas sanas de *C. roseus* que previamente fueron probadas por PCR, siendo negativas para fitoplasmas, a las cuales se le corto el tercio superior del tallo y este se desfolió de todas las hojas que pudiera haber en el tallo, dejando así conformado el portainjerto, al cual, en la punta del tallo, se le realizó un corte vertical de aproximadamente 3 cm, dentro del cual se puso el injerto infectado por fitoplasmas (Figura 10).

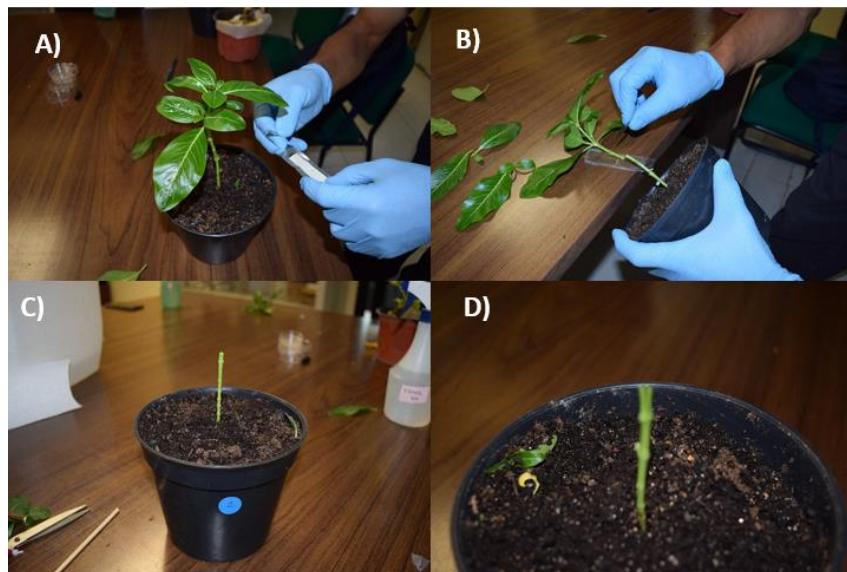


Figura 10. Formación del portainjerto. A) Planta joven de *C. roseus* utilizada como portainjerto. B) Corte del tercio superior. C) Vástago del portainjerto. D) Corte vertical en la punta del tallo.

Una vez teniendo listo la planta que funcionará como portainjerto, se procedió a cortar ramas sintomáticas de fitoplasmas, no mayores de 10 cm, que previamente fueron diagnosticadas como positivas por análisis molecular (por PCR).

En estas ramas, por lo general se apreciaron las estructuras florales modificadas, presentando virescencia, filodia y proliferación de hojas (Figura 11).



Figura 11. Estructuras florales de *C. roseus* modificadas por la presencia de fitoplasmas.

Este tipo de ramas se cortarón de la planta afectada, y en la base del tallo, se realizó un corte oblicuo de unos 2 cm de largo en ambas caras del tallo, el cual tiene la finalidad de exponer el tejido del floema al descubierto, para que este a la hora del injerto, tenga contacto con el propio del portainjerto (Figura 12).

Acto seguido, se realizó cuidadosamente la inserción del injerto entre el portainjerto, donde se tuvo el cuidado de no lastimar los tejidos y realizando presión ligera con los dedos, mientras con una tira de papel parafilm, se envolvió el injerto como mecanismo de sellado entre los tejidos y para evitar a la postre, infecciones de cualquier índole (Figura 13).



Figura 12. Unión del porta injertos con el injerto de *C. roseus* infectada con fitoplasmas.



Figura 13. Sellado de los tejidos con papel parafilm entre el injerto y el portainjerto.

Una vez realizado el injerto, las macetas fueron puestas nuevamente dentro de las cámaras bioclimáticas bajo las mismas condiciones climáticas controladas para su desarrollo y mantenimiento.

Después de ocho días de incubación, se rectificó la sobrevivencia de los injertos, encontrando a estos en buenas condiciones y observando incluso a los 15 días la aparición de brotes foliares nuevos en las ramas injertadas (Figura 14).



Figura 14. Los injertos desarrollándose en las cámaras bioclimáticas.

Conclusiones

Los fitoplasmas han revolucionado la forma en como entendemos muchos procesos fundamentales de la biología de los procariontes y también la forma en como sus

interacciones moldean la arquitectura de los ecosistemas, las interacciones de planta-patógeno y el papel de los parásitos dentro de la evolución. En los últimos años la búsqueda de nuevas tecnologías que permitan el cultivo de fitoplasmas en medios bacteriológicos, representaran la meta de muchos investigadores.

La comprensión a nivel molecular de los fitoplasmas encierra una gran parte de la historia de la vida en la tierra, no solo por el papel que juegan como importantes fuerzas de selección dentro de las poblaciones, sino también por la enorme diversidad genética de la que son herederos.

La incapacidad para mantener a estos organismos *in vitro* socaba de manera importante los esfuerzos que dentro de la investigación, se pretenden realizar para frenar los estragos que causarán a los cultivos de importancia económica para el hombre en los próximos años; sin embargo, las técnicas de transmisión inducida de fitoplasmas a organismos modelo como reservorio natural para su posterior investigación, son la mejor herramienta para enfrentar el entendimiento y manejo de estos organismos patogénicos.

En base a los resultados mostrados, se concluye que, de esta forma, se estableció un cepario para el mantenimiento *in vivo* de fitoplasmas (*Ca. Phytoplasma spp*), implementando con ello un protocolo para la creación de ceparios de fitoplasmas para cada especie aislada dentro de los proyectos de investigación del Campo Experimental Zacatecas.

Literatura Citada

- Ash, C., Farrow, J.A., Dorsch, M., Stackebrandt, E., Collins, M.D., 1991. Comparative analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and related species on the basis of reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 41, 343-346.
- Bai, x., 2004. Insect transmitted plant pathogenic mollicutes, *Spiroplasma kunkelii* and aster yellows witches'-broom phytoplasma: from structural genomics to functional genomics. The Ohio State University, p. 232.
- Bai, X., Zhang, J., Ewing, A., Miller, S.A., Jancso Radek, A., Shevchenko, D.V., Tsukerman, K., Walunas, T., Lapidus, A., Campbell, J.W., Hogenhout, S.A., 2006. Living with genome instability: the adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts. *Journal of bacteriology* 188, 3682-3696.
- Basset, A., Tzou, P., Lemaitre, B., Boccard, F., 2003. A single gene that promotes interaction of a phytopathogenic bacterium with its insect vector, *Drosophila melanogaster*. *EMBO reports* 4, 205-209.
- Beanland, L., Hoy, C., Miller, S., Nault, L., 2000. Influence of aster yellows phytoplasma on the fitness of aster leafhopper (Homoptera: Cicadellidae). *Annals of the Entomological Society of America* 93, 271-276.
- Block, A., Li, G., Fu, Z.Q., Alfano, J.R., 2008. Phytopathogen type III effector weaponry and their plant targets. *Current opinion in plant biology* 11, 396-403.
- Bosco, D., Tedeschi, R., 2013. Insect vector transmission assays, *Phytoplasma*. Springer, pp. 73-85.
- Camarena Gutiérrez, G., Almaraz, T., De La, R., 2008. Fitoplasmas: síntomas y características moleculares. *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 14, 81-87.

- Carraro, L., Loi, N., Ermacora, P., Gregoris, A., Osler, R., 1997. Transmission of pear decline by using naturally infected *Cacopsylla pyri* L, XVII International Symposium Virus and Virus-Like Diseases of Temperate Fruit Crops 472, pp. 665-668.
- Choi, Y.H., Tapias, E.C., Kim, H.K., Lefeber, A.W., Erkelens, C., Verhoeven, J.T., Brzin, J., Zel, J., Verpoorte, R., 2004. Metabolic discrimination of *Catharanthus roseus* leaves infected by phytoplasma using ¹H-NMR spectroscopy and multivariate data analysis. *Plant physiology* 135, 2398-2410.
- Christensen, N.M., Axelsen, K.B., Nicolaisen, M., Schulz, A., 2005. Phytoplasmas and their interactions with hosts. *Trends in Plant Science* 10, 526-535.
- Dickinson, M., 2010. Mobile units of DNA in phytoplasma genomes. *Molecular microbiology* 77, 1351-1353.
- Dickinson, M., Hodgetts, J., 2012. *Phytoplasma: Methods and Protocols*. Humana Press.
- Dickinson, M., Tuffen, M., Hodgetts, J., 2012. The Phytoplasmas: An Introduction, in: Dickinson, M., Hodgetts, J. (Eds.), *Phytoplasma: Methods and Protocols*. Humana Press, pp. 1-14.
- Dodds, P.N., Lawrence, G.J., Catanzariti, A.-M., Teh, T., Wang, C.-I., Ayliffe, M.A., Kobe, B., Ellis, J.G., 2006. Direct protein interaction underlies gene-for-gene specificity and coevolution of the flax resistance genes and flax rust avirulence genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 8888-8893.
- Doi, Y., Teranaka, M., Yora, K., Asuyama, H., 1967. Mycoplasma-or PLT group-like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches' broom, aster yellows, or paulownia witches' broom. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn* 33, 259-266.
- Favali, M., Musetti, R., Benvenuti, S., Bianchi, A., Pressacco, L., 2004. *Catharanthus roseus* L. plants and explants infected with phytoplasmas: alkaloid production and structural observations. *Protoplasma* 223, 45-51.

- Firrao, G., Gibb, K., Streten, C., 2005. Short taxonomic guide to the genus 'Candidatus Phytoplasma'. *Journal of Plant pathology*, 249-263.
- Fraser, C.M., Gocayne, J.D., White, O., Adams, M.D., 1995. The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science* 270, 197.
- Golino, D.A., Oldfield, G.N., Gumpf, D.J., 1989. Experimental hosts of the beet leafhopper-transmitted virescence agent. *Plant Disease* 73, 850-854.
- Griffiths, H., Gundersen, D., Sinclair, W., Lee, I.-M., Davis, R., 1994. Mycoplasma-like organisms from milkweed, goldenrod, and spirea represent two new 16S rRNA subgroups and three new strain subclusters related to peach X-disease MLOs. *Canadian journal of plant pathology* 16, 255-260.
- Gundersen, D., Lee, M., Davis, R., Kingsbury, D., 1994. Phylogeny of Mycoplasma-like Organisms (Phytoplasmas): a Basis for Their Classification. *Journal of Bacteriology* 176, 5244-5254.
- Gundersen, D.E., Lee, I.M., Schaff, D.A., Harrison, N.A., Chang, C.J., Davis, R.E., Kingsbury, D.T., 1996. Genomic diversity and differentiation among phytoplasma strains in 16S rRNA groups I (aster yellows and related phytoplasmas) and III (X-disease and related phytoplasmas). *International journal of systematic bacteriology* 46, 64-75.
- Guo, Y., Cheng, Z., Walla, J., 1998. Amplification and RFLP analysis of 23S ribosomal DNA from phytoplasmas. *Phytopathology* 88, S35.
- Hogenhout, S.A., Loria, R., 2008. Virulence mechanisms of Gram-positive plant pathogenic bacteria. *Current opinion in plant biology* 11, 449-456.
- Hoshi, A., Oshima, K., Kakizawa, S., Ishii, Y., Ozeki, J., Hashimoto, M., Komatsu, K., Kagiwada, S., Yamaji, Y., Namba, S., 2009. A unique virulence factor for proliferation and dwarfism in plants identified from a phytopathogenic bacterium. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 6416-6421.

- Jomantiene, R., Zhao, Y., Davis, R.E., 2007. Sequence-variable mosaics: composites of recurrent transposition characterizing the genomes of phylogenetically diverse phytoplasmas. *DNA and cell biology* 26, 557-564.
- Kakizawa, S., Oshima, K., Nishigawa, H., Jung, H.Y., Wei, W., Suzuki, S., Tanaka, M., Miyata, S., Ugaki, M., Namba, S., 2004. Secretion of immunodominant membrane protein from onion yellows phytoplasma through the Sec protein-translocation system in *Escherichia coli*. *Microbiology* 150, 135-142.
- Kirkpatrick, B., Smart, C., Blomquist, C., Guerra, L., Harrison, N., Ahrens, U., Lorenz, K., Schneider, B., Seemüller, E., 1994a. Identification of MLO strain-specific PCR primers obtained from 16/23S rRNA spacer sequences. *IOM Letters* 3, 261-262.
- Kirkpatrick, B., Smart, C., Gardner, S., Gao, J., Ahrens, U., Maurer, R., Schneider, B., Lorenz, K., Seemüller, E., Harrison, N., 1994b. Phylogenetic relationships of plant pathogenic MLOs established by 16/23S rDNA spacer sequences. *IOM Lett* 3, 228-229.
- Kube, M., Schneider, B., Kuhl, H., Dandekar, T., Heitmann, K., Migdoll, A.M., Reinhardt, R., Seemuller, E., 2008. The linear chromosome of the plant-pathogenic mycoplasma 'Candidatus Phytoplasma mali'. *BMC genomics* 9, 306.
- Kuske, C.R., Kirkpatrick, B.C., 1992. Phylogenetic relationships between the western aster yellows mycoplasma-like organism and other prokaryotes established by 16S rRNA gene sequence. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 42, 226-233.
- Lee, I.-M., Bottner-Parker, K., Zhao, Y., Davis, R., Harrison, N., 2010. Phylogenetic analysis and delineation of phytoplasmas based on secY gene sequences. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 60, 2887-2897.
- Lee, I.-M., Davis, R., 1992. Mycoplasmas which infect plants and insects. *American society for microbiology, washington, dc(usa)*. 379-390.

- Lee, I.-M., Davis, R.E., Gundersen-Rindal, D.E., 2000. Phytoplasma: Phytopathogenic Mollicutes. Annual Reviews in Microbiology 54, 221-255.
- Lee, I.-M., Gundersen, D., Hammond, R., Davis, R., 1994. Use of mycoplasma-like organism (MLO) group-specific oligonucleotide primers for nested-PCR assays to detect mixed-MLO infections in a single host plant. Phytopathology 84, 559-566.
- Lee, I.-M., Hammond, R., Davis, R., Gundersen, D., 1993. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. Phytopathology 83, 834-842.
- Lee, I.M., Gundersen-Rindal, D.E., Davis, R.E., Bottner, K.D., Marcone, C., Seemuller, E., 2004. 'Candidatus Phytoplasma asteris', a novel phytoplasma taxon associated with aster yellows and related diseases. International journal of systematic and evolutionary microbiology 54, 1037-1048.
- Liefting, L.W., Shaw, M.E., Kirkpatrick, B.C., 2004. Sequence analysis of two plasmids from the phytoplasma beet leafhopper-transmitted virescence agent. Microbiology 150, 1809-1817.
- Lim, P.-O., Sears, B.B., 1991. DNA sequence of the ribosomal protein genes rp12 and rps19 from a plant-pathogenic mycoplasma-like organism. FEMS microbiology letters 84, 71-73.
- Lim, P.O., Sears, B.B., 1989. 16S rRNA sequence indicates that plant pathogenic mycoplasma like organisms are evolutionary distinct from animal micoplasmas. Journal of Bacteriology 174, 260-261.
- Lim, P.O., Sears, B.B., 1992. Evolutionary Relationships of a Plant-Pathogenic Mycoplasma-like Organism and Acholeplasma laidlawii Deduced from Two Ribosomal Protein Gene Sequences. Bacteriology 174, 2606-2611.
- Liu, Z., Bos, J.I., Armstrong, M., Whisson, S.C., da Cunha, L., Torto-Alalibo, T., Win, J., Avrova, A.O., Wright, F., Birch, P.R., 2004. Patterns of diversifying selection in the phytotoxin-like scr74 gene

family of *Phytophthora infestans*. *Molecular biology and Evolution* 22, 659-672.

- Lough, T.J., Lucas, W.J., 2006. Integrative plant biology: role of phloem long-distance macromolecular trafficking. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57, 203-232.
- Ma, W., Dong, F.F., Stavrinides, J., Guttman, D.S., 2006. Type III effector diversification via both pathoadaptation and horizontal transfer in response to a coevolutionary arms race. *PLoS Genet* 2, e209.
- MacLean, A.M., Sugio, A., Makarova, O.V., Findlay, K.C., Grieve, V.M., Tóth, R., Nicolaisen, M., Hogenhout, S.A., 2011. Phytoplasma effector SAP54 induces indeterminate leaf-like flower development in *Arabidopsis* plants. *Plant physiology* 157, 831-841.
- Margulis, L., Chapman, M.J., 2009. *Kingdoms and domains: an illustrated guide to the phyla of life on Earth*. Academic Press.
- Martinelli, F., Reagan, R.L., Uratsu, S.L., Phu, M.L., Albrecht, U., Zhao, W., Davis, C.E., Bowman, K.D., Dandekar, A.M., 2013. Gene regulatory networks elucidating huanglongbing disease mechanisms. *PLoS one* 8, e74256.
- Marzachi, C., Milne, R., Bosco, D., Pandalai, S., 2004a. Phytoplasma-plant-vector relationships. *Recent research developments in plant pathology*, Vol. 3, 211-241.
- Marzachi, C., Milne, R.G., Bosco, D., Pandalai, S.G., 2004b. Phytoplasma-plant-vector relationships. *Recent research developments in plant pathology*, Vol. 3, 211-241.
- Mayer, C.J., Vilcinskas, A., Gross, J., 2008a. Pathogen-induced release of plant allomone manipulates vector insect behavior. *Journal of chemical ecology* 34, 1518-1522.
- Mayer, C.J., Vilcinskas, A., Gross, J., 2008b. Phytopathogen lures its insect vector by altering host plant odor. *Journal of chemical ecology* 34, 1045-1049.

- McCann, H.C., Guttman, D.S., 2008. Evolution of the type III secretion system and its effectors in plant–microbe interactions. *New Phytologist* 177, 33-47.
- McCoy, R., Caudwell, A., Chang, C., Chen, T., Chiykowski, L., Cousin, M., Dale, J., de Leeuw, G., Golino, D., Hackett, K., 1989. Plant diseases associated with mycoplasma-like organisms. In 'The Mycoplasmas Volume V, Spiroplasma, Acheloplasmata and Mycoplasmas of Plants and Arthropods.' (Eds RF Whitcomb, JG Tulley) pp. 545–640. Academic Press: New York.
- Minato, N., Himeno, M., Hoshi, A., Maejima, K., Komatsu, K., Takebayashi, Y., Kasahara, H., Yusa, A., Yamaji, Y., Oshima, K., 2014. The phytoplasmal virulence factor TENGU causes plant sterility by downregulating of the jasmonic acid and auxin pathways. *Scientific reports* 4.
- Murray, R., Schleifer, K., 1994. Taxonomic notes: a proposal for recording the properties of putative taxa of procaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 44, 174-176.
- Music, M.S., Skoric, D., 2013. Single-strand conformation polymorphism analysis for differentiating phytoplasma strains. *Methods in molecular biology* 938, 217-222.
- Namba, S., Oyaizu, H., Kato, S., Iwanami, S., Tsuchizak, T., 1993. Phylogenetic Diversity of Phytopathogenic Mycoplasma-like Organisms. *Systematic Bacteriology* 43, 461-467.
- Nishigawa, H., Miyata, S., Oshima, K., Sawayanagi, T., Komoto, A., Kuboyama, T., Matsuda, I., Tsuchizaki, T., Namba, S., 2001. In planta expression of a protein encoded by the extrachromosomal DNA of a phytoplasma and related to geminivirus replication proteins. *Microbiology* 147, 507-513.
- Nishigawa, H., Oshima, K., Kakizawa, S., Jung, H.Y., Kuboyama, T., Miyata, S., Ugaki, M., Namba, S., 2002. A plasmid from a non-insect-transmissible line of a phytoplasma lacks two open reading frames that exist in the plasmid from the wild-type line. *Gene* 298, 195-201.

- Olivares-Mercado, P.X., 2013. Identificación filogenética de *Candidatus Liberibacter solanacearum* y su efecto en la calidad fisiológica de la semilla de chile jalapeño, Recursos Genéticos y Productividad Producción de Semillas. Colegio de Postgraduados, Montecillos.
- Orlovskis, Z., Canale, M.C., Thole, V., Pecher, P., Lopes, J.R., Hogenhout, S.A., 2015. Insect-borne plant pathogenic bacteria: getting a ride goes beyond physical contact. *Current Opinion in Insect Science* 9, 16-23.
- Oshima, K., Kakizawa, S., Nishigawa, H., Jung, H.Y., Wei, W., Suzuki, S., Arashida, R., Nakata, D., Miyata, S., Ugaki, M., Namba, S., 2004. Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of a plant-pathogenic phytoplasma. *Nature genetics* 36, 27-29.
- Oshima, K., Kakizawa, S., Nishigawa, H., Kuboyama, T., Miyata, S., Ugaki, M., Namba, S., 2001. A plasmid of phytoplasma encodes a unique replication protein having both plasmid- and virus-like domains: clue to viral ancestry or result of virus/plasmid recombination? *Virology* 285, 270-277.
- Padovan, A., Gibb, K., 1998. Progress in understanding phytopathogenic mollicute genome organization, *Proc 12th Conf Int Org. Mycoplasmol*, Jul, pp. 22-28.
- Pracos, P., Renaudin, J., Eveillard, S., Mouras, A., Hernould, M., 2006. Tomato flower abnormalities induced by stolbur phytoplasma infection are associated with changes of expression of floral development genes. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* 19, 62-68.
- Razin, S., 1998. *Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas*. *Microbiology and Molecular Biology* 62, 1094–1156.
- Reveles-Torres, L.R., Velásquez-Valle, R., Mauricio-Castillo, J.A., 2015. *Fitoplasmas: Otros agentes fitopatógenos*.
- Samanani, N., Alcantara, J., Bourgault, R., Zulak, K.G., Facchini, P.J., 2006. The role of phloem sieve elements and laticifers in the

biosynthesis and accumulation of alkaloids in opium poppy. *The Plant Journal* 47, 547-563.

- Schneider, B., Ahrens, U., Kirkpatrick, B.C., Seemüller, E., 1993. Classification of plant-pathogenic mycoplasma-like organisms using restriction-site analysis of PCR-amplified 16S rDNA. *Microbiology* 139, 519-527.
- Schneider, B., Gibb, K.S., Seemüller, E., 1997. Sequence and RFLP analysis of the elongation factor Tu gene used in differentiation and classification of phytoplasmas. *Microbiology* 143, 381-3389.
- Schneider, B., Seemüller, E., Smart, C.D., Kirkpatrick, B.C., 1995. Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas, in: Razin, S., Tully, J.G. (Eds.), *Molecular and Diagnostics procedures in Mycoplasmaology*. Academic Press, New York. , pp. 369-380.
- Sears, B., Kirkpatrick, B., 1994. Unveiling the evolutionary relationships of plant-pathogenic mycoplasma-like organisms. Phylogenetic insights may provide the key to culturing phytoplasmas. *ASM News (Washington)* 60, 307-312.
- Seemüller, E., Marcone, C., Lauer, U., Ragozzino, A., Göschl, M., 1998. Current status of molecular classification of the phytoplasmas. *Plant Pathology* 80, 3-26.
- Seemüller, E., Schneider, B., Maurer, R., Ahrens, U., Daire, X., Kison, H., Lorenz, K., Firrao, G., Avineni, L., Sears, B.B., Stackebrandt, E., , 1994. Phylogenetic Classification of Phytopathogenic Mollicutes by Sequence Analysis of 16s Ribosomal DNA. *Systematic Bacteriology* 44, 440-446.
- Smart, C.D., Schneider, B., Blomquist, C.L., Guerra, L.J., Harrison, N.A., Ahrens, U., Lorenz, K.H., Seemüller, E., Kirkpatrick, B. C., 1996. Phytoplasma-Specific PCR Primers Based on Sequences of the 16S-23S rRNA Spacer Region. *Applied and environmental microbiology* 62, 2988-2993.
- Stackebrandt, E., Goebel, B., 1994. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present

species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 44, 846-849.

Stavrinos, J., Ma, W., Guttman, D.S., 2006. Terminal reassortment drives the quantum evolution of type III effectors in bacterial pathogens. *PLoS Pathog* 2, e104.

Sugio, A., Hogenhout, S.A., 2012. The genome biology of phytoplasma: modulators of plants and insects. *Current opinion in microbiology* 15, 247-254.

Toruno, T.Y., Music, M.S., Simi, S., Nicolaisen, M., Hogenhout, S.A., 2010. Phytoplasma PMU1 exists as linear chromosomal and circular extrachromosomal elements and has enhanced expression in insect vectors compared with plant hosts. *Molecular microbiology* 77, 1406-1415.

Toth, K.F., Harrison, N., Sears, B.B., 1994. Phylogenetic Relationships among Members of the Class Mollicutes Deduced from rps3 Gene Sequences. *Systematic Bacteriology* 44, 119-124.

Tran-Nguyen, L.T., Kube, M., Schneider, B., Reinhardt, R., Gibb, K.S., 2008. Comparative genome analysis of "Candidatus Phytoplasma australiense" (subgroup tuf-Australia I; rp-A) and "Ca. Phytoplasma asteris" Strains OY-M and AY-WB. *Journal of bacteriology* 190, 3979-3991.

Turgeon, R., Wolf, S., 2009. Phloem transport: cellular pathways and molecular trafficking. *Annual review of plant biology* 60, 207-221.

Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., Kersters, K., Swings, J., 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological reviews* 60, 407-438.

Wayne, L., 1987. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int. J. Syst. Bacteriol* 37, 463-464.

Weintraub, P.G., Beanland, L., 2006. Insect vectors of phytoplasmas. *Annu. Rev. Entomol.* 51, 91-111.

- Weintraub, P.G., Jones, P., 2010. *Phytoplasmas: Genomes, Plant Hosts and Vectors*. Wallingford, UK:, CABI
- Weisburg, W.G., Tully, J.G., Rose, D.I., Petzel, J.P., Oyaizu, H., Yang, D., Mandelco, L., Sechrest, J., Lawrence, T.G., Eten, j., Maniloff, J., Woese, C.R., 1989. A Phylogenetic Analysis of the Mycoplasmas: Basis for Their Classification. *Bacteriology* 171, 6455-6467.
- Win, J., Morgan, W., Bos, J., Krasileva, K.V., Cano, L.M., Chaparro-Garcia, A., Ammar, R., Staskawicz, B.J., Kamoun, S., 2007. Adaptive evolution has targeted the C-terminal domain of the RXLR effectors of plant pathogenic oomycetes. *The Plant Cell* 19, 2349-2369.
- Woese, C., Maniloff, J., Zablen, L., 1980. Phylogenetic analysis of the mycoplasmas. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 77, 494-498.
- Woese, C.R., 1987. Bacterial evolution. *Microbiological reviews* 51, 221.
- Wulff, N.A., Zhang, S., Setubal, J.C., Almeida, N.F., Martins, E.C., Harakava, R., Kumar, D., Rangel, L.T., Foissac, X., Bové, J.M., 2014. The complete genome sequence of 'Candidatus *Liberibacter americanus*', associated with citrus huanglongbing. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 27, 163-176.
- Zimmer, C., 2000. *Parasite rex: inside the bizarre world of nature's most dangerous creatures*. Simon and Schuster.

REVISIÓN TÉCNICA Y EDICIÓN

Dr. Jorge A. Zegbe Domínguez
INIFAP Zacatecas

Dr. Jorge Armando Mauricio Castillo
Unidad Académica de Agronomía UAZ

DISEÑO DE PORTADA

Luis Roberto Reveles Torres

CÓDIGO INIFAP

MX-0-241709-44-02-11-09-87

ENCARGADA DE LA COMISIÓN EDITORIAL DEL CEZAC

Dra. Raquel K. Cruz Bravo

Grupo Colegiado del CEZAC

Presidente: Dr. Jaime Mena Covarrubias

Secretario: MC. Ricardo Alonso Sánchez Gutiérrez

Vocal: Dr. Luis Roberto Reveles Torres

Vocal: Dr. Guillermo Medina García

Vocal: Ing. Manuel Reveles Hernández

Vocal: Dr. Francisco Echavarría Cháirez

Vocal: MC. Mayra Denise Herrera

La presente publicación se terminó de imprimir en formato electrónico en noviembre de 2017 en el Campo Experimental Zacatecas, Km 24.5 carr Zacatecas-Fresnillo. CP. 98500, Calera de V. R., Zacatecas, México.

Tel. 01 800 088 2222 ext 82328

CAMPO EXPERIMENTAL ZACATECAS

DIRECTORIO

MC. Ricardo Alonso Sánchez Gutiérrez
Director de Coordinación y Vinculación

Dr.	Guillermo Medina García	Agrometeorología y Modelaje
MC.	Nadiezhdha Y. Ramírez Cabral*	Agrometeorología y Modelaje
Dr.	Manuel de Jesús Flores Nájera	Carne de Rumiantes
Dr.	Alfonso Serna Pérez	Fertilidad de suelos y nutrición vegetal
Ing.	José Ángel Cid Ríos*	Fríjol y Garbanzo
MC.	Juan José Figueroa González	Fríjol y Garbanzo
MC.	Mayra Denise Herrera	Fríjol y Garbanzo
Dr.	Jorge A. Zegbe Domínguez	Frutales
MC	Valentín Melero Meraz	Frutales
Ing.	Manuel Reveles Hernández	Hortalizas
MC.	Miguel Servin Palestina	Ingeniería de Riego
Dra.	Raquel Cruz Bravo	Inocuidad de Alimentos
MC	Enrique Medina Martínez	Maíz
MC.	Francisco A. Rubio Aguirre	Pastizales y Cultivos Forrajeros
Dr.	Ramón Gutiérrez Luna	Pastizales y Cultivos Forrajeros
Ing.	Ricardo A. Sánchez Gutiérrez	Pastizales y Cultivos Forrajeros
Dr.	Luis Roberto Reveles Torres	Recursos Genéticos: Forestales, Agrícolas, Pecuarios y Microbianos
Dr.	Jaime Mena Covarrubias	Sanidad Forestal y Agrícola
Dr.	Rodolfo Velásquez Valle	Sanidad Forestal y Agrícola
Dra.	Blanca I. Sánchez Toledano	Socioeconomía

* Becarios

WWW.INIFAP.GOB.MX