

INOCULACIÓN EXPERIMENTAL DE TRES ESPECIES HOSPEDERAS DE FITOPLASMAS EN BOGOTÁ, COLOMBIA

EXPERIMENTAL INOCULATION OF
THREE SPECIES OF PHYTOPLASMA HOST
OLEACEAE IN BOGOTA, COLOMBIA

Laura Margarita Perilla Henao¹

Clara Gilma Gutiérrez Castañeda¹

Juan José Filgueira²

Liliana Franco-Lara^{2,3}

Fecha de recepción: 1 de septiembre de 2010

Fecha de aceptación: 5 de noviembre de 2010

1 Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Facultad de Ciencias Básicas, Universidad Militar Nueva Granada.

2 Docente Facultad de Ciencias, Programa de Biología Aplicada, Universidad Militar Nueva Granada.

3 Autor para correspondencia: liliana.franco@unimilitar.edu.co

RESUMEN

Los Urapanes (*Fraxinus* sp.) en Colombia presentan problemas sanitarios como la infección con fitoplasmas del grupo 16SrRNA VII. Para tratar de superar la dificultad que significa trabajar con árboles de gran tamaño, se realizaron ensayos para buscar huéspedes vegetales alternativos que mejoraran la accesibilidad a estos patógenos. En este estudio se hicieron ensayos de inoculación de fitoplasmas de Urapán, permitiendo la visita libre de insectos, sobre cuatro especies vegetales de las familias Solanaceae y Apiaceae como potenciales hospederos alternativos. Una alta proporción de las plantas de *Apium graveolens* expuestas a insectos (86%) resultó infectada con fitoplasmas, según la sintomatología desarrollada, test DAPI y pruebas moleculares. Una proporción menor de las plantas expuestas de *Nicotiana tabacum* (50%) y *Nicotiana debneyi* (10%) presentaron síntomas asociados a infección por fitoplasmas y fueron positiva por test DAPI, mientras que las plantas de *Lycopersicon esculentum* expuestas no resultaron infectadas. Observaciones mediante el test DAPI mostraron que en las plantas infectadas, los fitoplasmas no presentaron una tendencia marcada a concentrarse en ningún tejido en particular.

Palabras clave: Fitoplasmas, Ash Y, *Apium graveolens*, *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana debneyi*.

ABSTRACT

Ash trees (*Fraxinus* sp.) in Colombia are affected by sanitary problems such as phytoplasmas of group 16SrRNA VII. To try to overcome the difficulty associated to working with large trees, essays to find alternative plant hosts were performed to

to improve the accessibility to these pathogens. In this study, inoculation tests of phytoplasmas of Urapan were performed, allowing free insect visit on four plant species of families Solanaceae y Apiaceae as potential alternative hosts. A large proportion of the *Apium graveolens* plants exposed to insects (86%) resulted in infection with phytoplasmas according to the symptoms that developed, test DAPI and molecular tests. A smaller proportion of plants exposed of *Nicotiana tabacum* (50%) and *Nicotiana debneyi* (10%) presented symptoms associated with phytoplasmas and were DAPI positive, meanwhile exposed *Lycopersicon esculentum* plants were not infected. Observations of DAPI tests showed that in infected plants, phytoplasmas did not show a marked tendency to concentrate in any particular tissue.

Key words: Phytoplasmae, Ash Y, *Apium graveolens*, *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana debneyi*.

INTRODUCCIÓN

En el pasado, fitoplasmas del grupo 16Sr-VII-A Ash Y se han detectado en árboles de Urapán (*Fraxinus* sp) en Bogotá y otras regiones de la zona Andina Colombiana (Filgueira *et al.*, 2004), asociados a síntomas que incluyen amarillamiento del follaje, defoliación, formación de brotes epicórmicos, ramificación en copo, hoja pequeñas entre otros (Franco-Lara & Filgueira, 2005). Este grupo de fitoplasmas también afecta plantas de los géneros *Fraxinus* y *Syringa* en Norte América, produciendo síntomas similares (Sinclair *et al.*, 1996; Sinclair and Griffiths, 1994; Sinclair and Griffiths, 2000).

Los fitoplasmas, son bacterias de la clase Mollicutes, que carecen de pared celular (Lee *et al.*, 2000). Mediante microscopía electrónica, se

observan como formas pleomórficas de menos de 1µm (Doi *et al.*, 1967; Hearon *et al.*, 1976). Son simbioses obligados del floema de las plantas que infectan (Doi *et al.*, 1967) y de insectos, los cuales en se comportan como vectores cuando se alimentan del floema y dispersan los fitoplasmas entre plantas (Weintraub & Beanland, 2006). Hasta la fecha, los fitoplasmas no han podido ser cultivados *in vitro* como cultivos puros fuera de sus hospederos (Christensen *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2000). Esto probablemente se debe a que los fitoplasmas poseen genomas reducidos (aproximadamente 750 Kb), que carecen de rutas metabólicas que se consideran indispensables para la vida libre (no parasítica), tales como enzimas para la síntesis *de novo* de aminoácidos, ácidos grasos y nucleótidos. Además, carecen de la vía de salvamento para la síntesis de de nucleótidos y de ATP sintasa (Bai *et al.*, 2004; Oshima *et al.*, 2004) y también carecen de la proteína similar a tubulina FtsZ, que se pensaba que era indispensable para la división celular (Christensen *et al.*, 2005).

Los fitoplasmas son responsables de causar enfermedades en cientos de plantas en todo el mundo, incluyendo plantas económicamente importantes como hortalizas, frutales, árboles maderables, flores de corte entre otros (Lee *et al.*, 2000). Son patógenos de gimnospermas, monocotiledoneas y dicotiledoneas (Lee *et al.*, 2000; Schneider *et al.*, 2005) y se han reportado en por lo menos 200 especies hospederas (Hogenhout *et al.*, 2008).

Debido a la incapacidad de obtener cultivos puros de fitoplasmas, tradicionalmente el diagnóstico se hacía a partir de la caracterización de los síntomas y la observación por microscopía electrónica de cuerpos parecidos a micoplasmas

(MLOs por sus siglas en inglés) en cortes ultra delgados de los tejidos de las plantas afectadas. En algunos casos, el tratamiento con tetraciclina y la mejoría observada, permitía llegar a la confirmación de la existencia de fitoplasmas en las plantas (Ishii *et al.*, 1967). La prueba DAPI es un método microscópico utilizado para la detección de fitoplasmas en tejidos vegetales infectados (Seemuller, 1976; Jones, 2002; Sinclair *et al.*, 1989); Sinclair *et al.*, 1996; Sinclair & Griffiths, 1997). El fluorocromo DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindole 2HCL) tiene alta afinidad por ADN de doble cadena rico en A:T (adenina:timina) el cual es característico de los fitoplasmas. Como en otras bacterias, en la actualidad el análisis de PCR anidada del gen 16SrRNA es la prueba más comúnmente usada para la detección e identificación taxonómica de los fitoplasmas (Lee *et al.*, 1995; Smart *et al.*, 1996).

Los fitoplasmas son dispersados de plantas infectadas a hospederos susceptibles por cuatro mecanismos: i) vegetación propagativa o injerto, ii) conexiones vasculares entre plantas infectadas y no infectadas por plantas ectoparasitas como *Cuscuta* sp. iii) insectos vectores chupadores de savia de que transmiten de manera persistente (Weintraub y Beanland, 2006) y, iv) en casos excepcionales por semilla (Khan *et al.*, 2002). Los vectores de los fitoplasmas son del orden Hemiptera y son principalmente cicadélidos, fulgoromorfos y psyllidos (Weintraub & Beanland, 2006). El vector de los fitoplasmas del grupo 16SrRNA VII-A no es conocido ni en Estados Unidos (Matteoni & Sinclair, 1988; Sinclair & Griffiths, 1994; Feeley *et al.*, 2001) ni en Colombia. Observaciones anteriores (resultados no presentados) mostraron que en Bogotá, el vector de los fitoplasmas del grupo Ash Yellows

(Ash Y) es capaz de transmitir fitoplasmas a otras especies de plantas diferentes a *Fraxinus*. Con el fin de encontrar posibles hospederos alternativos para este fitoplasma, plantas de *Apium graveolens*, *Nicotiana tabacum* cv Samsun, *Nicotiana debneyi* y *Lycopersicum esculentum* se colgaron de árboles de *Fraxinus* con síntomas de fitoplasmas, para permitir la visita libre de insectos vectores que transmiten los fitoplasmas. La presencia de fitoplasmas se determinó en diferentes especies y órganos por el test DAPI y mediante la evaluación de síntomas; en apio se detectaron fitoplasmas también usando técnicas moleculares (PCR y Southern Blot).

METODOLOGÍA

Inoculación de hospederos

Los hospederos evaluados fueron *Lycopersicum esculentum*, *Apium graveolens*, (Variedades: dulce y Tall-UTAH), *Nicotiana debneyi*, *Nicotiana tabacum* cv. Samsun, y *Fraxinus* sp. jóvenes (seis meses de edad). Todas las plantas se obtuvieron a partir de semilla, a excepción de *Apium graveolens* var dulce que provino de un cultivo comercial pero que carecía de síntomas de fitoplasmosis. A los dos meses, los brotes germinados se trasplantaron a materas con una mezcla de tierra:cascarilla (3:1). La inoculación de los hospederos se hizo permitiendo la visita libre de insectos a plantas libres de fitoplasmas, las cuales fueron colgadas del follaje de Urapanes adultos sintomáticos, durante periodos que variaron de 20 a 60d. Paralelamente se mantuvieron plantas control de las mismas especies en jaulas libres de insectos. Los hospederos evaluados, edad y tiempo de infección se resumen en la tabla 2.

Adicionalmente, plantas jóvenes de *Fraxinus* y *Catharantus roseus* fueron infectadas mediante la planta ectoparásita *Cuscuta subinclusa*. Brotes de *C. subinclusa* se colocaron sobre plantas de sintomáticas de Urapán hasta que se establecieron apresorios. Después, se colocaron las plantas receptoras libres de fitoplasmas (*Fraxinus* y *C. roseus*) para permitir que *C. subinclusa* estableciera conexiones entre las planta donadoras y receptoras.

Test DAPI

La detección de los fitoplasmas se hizo mediante el test DAPI sobre cortes longitudinales del tejido vegetal, hechos a mano alzada. Los cortes fueron teñidos con el fluorocromo DAPI (0.004 mg/ml) en buffer fosfato (NaCl 0.9%, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.04%, Na_2HPO_4 0.11%), más glutaraldehído 2.5% (Sinclair et al., 1989). Los cortes fueron observados al microscopio de luz Axioskop 40 FL Plus Carl Zeissâ, con el filtro 0424-879 G 365 marca Zeissâ (excitación 390nm, emisión 460 nm). DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole 2HCl) se une al ADN haciéndolo fluorescente bajo la luz ultravioleta. En secciones de tejidos vegetales teñidos con DAPI y observados al microscopio, los fitoplasmas se observan como manchas fluorescentes blanco-azuladas dentro de los tubos del floema, mientras que tubos no infectados permanecen oscuros (Sinclair et al., 1996). Las observaciones fueron realizadas sobre un campo de observación al azar a 400X y el registro fotográfico se realizó con el aumento de 4.0X.

Con el fin de determinar la región de la planta con mayor número de fitoplasmas, tallos, hojas y raíces de tres plantas de *A. graveolens* fueron analizadas por DAPI. El análisis

de hojas y tallos se hizo estratificadamente (apical, medio y basal). De cada estrato se observaron 10 campos al azar provenientes de tres plantas sintomáticas y se determinó si la concentración de fitoplasmas estaba en el rango bajo (1-4 manchas) o alto (>5 manchas). Las observaciones se hicieron a 400 X.

Descripción de síntomas

Se registraron los síntomas que se asocian a fitoplasmas, en las plantas expuestas a la visita libre de insectos. El desarrollo de estas plantas se comparó con el de plantas mantenidas en el laboratorio en jaulas libres de insectos.

Detección molecular de fitoplasmas

Plantas de apio expuestas positivas por tinción DAPI, se usaron para detección de fitoplasmas mediante técnica de PCR y por hibridación de una región del gen ribosomal 16Sr. El ADN de *A. graveolens* se obtuvo utilizando el protocolo para la extracción de cromosomas completos (Neimark & Kirkpatrick, 1993) con las modificaciones sugeridas por Marcone et al. (1999).

Para confirmar la presencia de fitoplasmas en las muestras de apio evaluadas se hicieron ensayos de PCR anidada para detectar la presencia del gen 16SrRNA de fitoplasmas con los cebadores R16mF2/R16mR1, seguida por PhyRNAF3.3/R16R2 (Tabla 1). Las reacciones se hicieron en 15µl, teniendo en cuenta las siguientes concentraciones finales: 0.2 mM dNTPS, 0.2 mM de cada cebador, 1X de buffer, 2.5mM de MgCl₂, 0.05 U/ml *Taq* polimerasa (New England®), 2.5-5µm de ADN molde y agua MiliQ hasta llevar a volumen. El perfil térmico que se siguió fue

el siguiente: 1 ciclo de denaturación a 95°C por 5 minutos; denaturación por 1 minuto a 90°C, anillamiento 1 minuto a 54 °C (primaria) y 55 °C (anidada) y extensión 2 minutos a 72 °C durante 35 ciclos; 1 ciclo de extensión final a 72 °C por 10 minutos. Las amplicones se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% en TBE (Trizma base 89mM, Ácido bórico 89mM, EDTA 2mM.2H₂O), teñido con bromuro de etidio (0.5 mg/ml) en transiluminador con luz ultravioleta.

Para el análisis por Southern blot, el ADN total extraído de las plantas de apio, se cortó con la endonucleasa de restricción *Sma*I New England® según recomendaciones del fabricante y se separó mediante electroforesis de campo pulsado (PFGE por su sigla en inglés) en el sistema CHEF-DRII (Bio-Rad®) usando como marcador de peso molecular *Saccharomyces cerevisiae* (Bio-Rad®). La electroforesis se realizó en gel de agarosa Pulse Field Certified 1% en buffer TBE 0.5X recirculado a 14° C, pulso de 60-120s, voltaje 6V/cm, tiempo de corrida 24h. El gel se tiñó con bromuro de etidio (0.5 mg/ml) y se visualizó en transiluminador con luz ultravioleta. Se realizó transferencia capilar del ADN en el gel separado por PFGE hacia una membrana Nylon Hybond Amersham® según el protocolo de DIG Application del fabricante Roche®.

Se elaboró una sonda mediante 'random priming' con ADN molde del producto de PCR de los cebadores R16F2/R16R2 (1245 pb) a partir de un clon que contiene un fragmento del gen 16SrDNA de AshY de Colombia (Accesión GenBank EF150365.1). El producto de PCR se purificó con QIAquick Gel Extraction kit de Quiagen®, se cuantificó el ADN usando

Cebador	Secuencia 5'-3'	Referencia
R16mF2	CAT CGA AGT CGA ACG GA	Gundersen y Lee, 1996
R16mR1	CTT AAC CTC CAA TCA TCG AC	Gundersen y Lee, 1996
PhyRNAF.3	AAT AGT GGA AAA ACT ATC	Gaitán, 2003
R16R2	GAA ACG ACT GCT AAG ACT GC	Gundersen y Lee, 1996

Tabla 1. Cebadores usados para verificación por PCR anidada.

el fluorímetro Hoefer DyNA Quant 200 de Amersham Biosciences® según instrucciones del fabricante. Para la elaboración de la sonda, el ADN molde se marcó con digoxigenina mediante el kit 'DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II' de Roche®. Se detectó con quimiluminiscencia y se estableció el rendimiento de la sonda producida. La hibridación de la sonda sobre la membrana de nylon se realizó a 42°C, se usó el protocolo DIG de Roche, se detectó mediante quimioluminiscencia, se expuso sobre una película BioMax XAR Film de Kodak y se reveló según indicaciones del fabricante Kodak®.

RESULTADOS

Inoculación de hospederos

En este estudio, plantas de *A. graveolens* Var Tall- UTAH 52-70, *A. graveolens* Var dulce, *N. debneyi*, *N. tabacum* cv. Samsun, *L. esculentum* y *F. uhdei* fueron expuestas a la visita libre de insectos, colocándolas entre las ramas de árboles de *Fraxinus uhdei* infectados con fitoplasmas, en

Bogotá. Después de tiempos variables de exposición, las plantas fueron llevadas al laboratorio donde se registró el desarrollo de síntomas sugerentes de fitoplasmosis y un subgrupo de plantas fue evaluado por DAPI (Tabla 2).

Una muestra de las plantas con síntomas fue evaluada para confirmar la presencia de fitoplasmas por DAPI en diferentes órganos de la planta. La Figura 2 presenta un ejemplo de muestras DAPI negativas (Figura 2A) y positivas con un número bajo o alto de fitoplasmas (Figura 2B y 2C).

El 86% (Tabla 2) de las plantas de *A. graveolens* (de las dos variedades) expuestas a la visita libre de insectos desarrollaron síntomas típicos de fitoplasmosis, tales como amarillamiento (Figura 1H), necrosis del floema del tejido foliar y del tallo (Figura 1D), disminución del tamaño y número de las raíces (Figura 1F). También presentaron cambios que se asociaron con desbalance de los reguladores de crecimiento tales como enanismo (Figura 1H), proliferación de brotes (Figura 1H), cambio en la disposición de los folíolos en los tallos (Figura 1 B y C), y hojas pequeñas.

Las plantas expuestas fueron positivas por DAPI (Figura 2) y exhibieron una morfología claramente diferente a las no expuestas (Figura 1 H).

De ocho plantas expuestas de *N. tabacum*, cuatro plantas sobrevivieron el periodo de inoculación y dos presentaron síntomas que incluían amarillamiento, necrosamiento del floema de las hojas y defoliación. Las dos plantas sintomáticas fueron positivas por DAPI (Tabla 2). Por otro lado, solo una de 10 plantas de *N. debneyi* expuestas al vector, presentó síntomas de enanismo, arrosetamiento de las hojas, no desarrolló flores y fue positiva por DAPI (Tabla 2, Figura 1 H). Las nueve plantas restantes de *N. debneyi* no presentaron síntomas asociados a fitoplasmosis, florecieron en un periodo de

tiempo comparable al de plantas control no expuestas y fueron negativas por DAPI. Por último, once plantas de *L. esculentum* fueron expuestas, en dos ensayos independientes (en el primero se usaron plantas de 2 meses de edad y en el segundo plantas de 6 meses de edad); de estas solo sobrevivieron cuatro. Las plantas de tomate expuestas no presentaron síntomas asociados con fitoplasmas y fueron DAPI negativas.

Dos plantas de *F. uhdei* jóvenes fueron expuestas a la visita de insectos, pero solo una sobrevivió al periodo de inoculación (Tabla 2). Esta planta mostró síntomas como disminución del crecimiento debido al acortamiento de los entrenudos, hojas pequeñas, proliferación de brotes y defoliación (Figura 1G). Debido a que

Especie	PE	Edad	TE	So	P. Sint	DAPI + / So
<i>A. graveolens</i> Var Tall- UTAH 52-70	5	6 meses	60 días	4	4	2/2
<i>A. Graveolens</i> Var dulce	10	6 meses	40 días	10	8	2/2
<i>Nicotiana debneyi</i>	10	5 meses	60 días	9	1	1/1
<i>Nicotiana tabacum</i> cv. Samsun	8	5 meses	60 días	4	2	2/2
<i>Lycopersicum esculentum</i>	6	2 meses	20 días	1	0	0/1
	5	5 meses	43 días	3	0	0/3
<i>Fraxinus uhdei</i>	2	4 meses	80 días	1	1*	3/3

PE: Total de plantas expuestas
Ed: Edad planta al momento se ser expuesta
TE: Tiempo de exposición
So: No. Plantas que sobrevivieron
P. Sint: No. Plantas con síntomas
DAPI + / So: No. Plantas DAPI positivas/No. Plantas evaluadas

* La planta de *F. uhdei* que sobrevivió no pudo ser evaluada por DAPI porque tenía muy pocas hojas, entonces fue usada para infectar tres plantas jóvenes (6 meses) mediante *Cuscuta*. Todas las plantas inoculadas por *Cuscuta* fueron positivas por DAPI y presentaron síntomas de fitoplasmosis.

Tabla 2. Plantas expuestas al insecto vector que desarrollaron síntomas

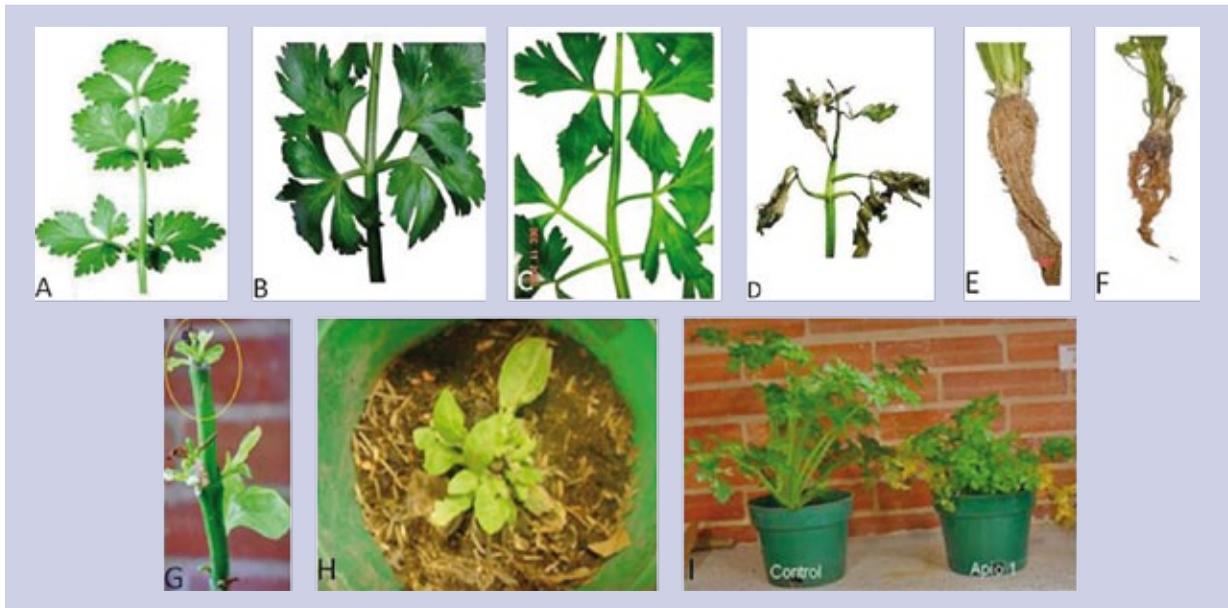


Figura 1. Algunos síntomas observados en los hospederos evaluados. A. *A. graveolens* no expuesto (control sano) mostrando folíolos opuestos. B y C. *A. graveolens* con folíolos alternados de forma anormal o con patrones de atípicos de ramificación. D. Necrosis de hojas y floema. E. Raíces de *A. graveolens* de planta no expuesta. F. Raíces de *A. graveolens* de planta expuesta al insecto vector mostrando disminución de la longitud y número de raíces. Las plantas mostradas en E y F eran de la misma edad. G. *F. uhdei* expuesto a insectos mostrando folíolos en posiciones atípicas. H. *N. benthamiana* exhibiendo enanismo, arrosetamiento y cambio de la arquitectura de la planta. I. Plantas de *A. graveolens*, control sano no expuesto (izquierda), planta infectada expuesta con síntomas de enanismo, rebrotación y amarillamiento (derecha); las plantas son de la misma edad.

la planta sintomática tenía muy pocas hojas para hacer análisis de DAPI, esta fue usada para inocular otras tres plantas jóvenes de *F. uhdei* mediante la ectoparásita *Cuscuta*. Los tres urapanes receptores fueron positivos por DAPI y mostraron síntomas como amarillamiento, rebrotación, acortamiento de los entrenudos y defoliación, demostrando que la planta donante inoculada mediante exposición al vector había sido efectivamente infectada.

Los síntomas en las plantas de *N. tabacum* fueron principalmente necrosamiento del floema de las hojas y defoliación. La planta de *N. debneyi* que se infectó presentó enanismo severo, arrosetamiento de las hojas, amarillamiento y no desarrolló flores (Figura 1). De ocho plantas expuestas de *N. tabacum*, cuatro plantas sobrevivieron

el periodo de inoculación y dos presentaron síntomas que incluían amarillamiento, necrosamiento del floema de las hojas y defoliación. Las dos plantas sintomáticas fueron positivas por DAPI (Tabla 2). Por otro lado, solo una de 10 plantas de *N. debneyi* expuestas al vector, presentó síntomas de enanismo, arrosetamiento de las hojas, no desarrolló flores y fue positiva por DAPI (Tabla 2, Figura 1 H). Las nueve plantas restantes de *N. debneyi* no presentaron síntomas asociados a fitoplasmosis, florecieron en un periodo de tiempo comparable al de plantas control no expuestas y fueron negativas por DAPI.

Por último, once plantas de *L. esculentum* fueron expuestas, en dos ensayos independientes (en el primero se usaron plantas de 2 meses de edad y en el segundo plantas de 6 meses de edad); de

estas solo sobrevivieron cuatro. Las plantas expuestas de tomate no presentaron síntomas asociados con fitoplasmas y fueron DAPI negativas.

Distribución de fitoplasmas dentro de las plantas infectadas

Una muestra de las plantas con síntomas fue evaluada para confirmar la presencia de fitoplasmas por DAPI en diferentes órganos de la planta. La Figura 2 presenta un ejemplo de muestras DAPI negativas (Figura 2A) y positivas con un número bajo o alto de fitoplasmas (Figura 2B y 2C). Las plantas de *A. graveolens*, *N. tabacum*, *N. debneyi* y *F. uhdei* escogidas para la evaluación por DAPI, habían sido expuestas a la visita libre de insectos y presentaban síntomas de fitoplasmosis, en comparación con plantas no expuestas que se consideraron como controles libres de fitoplasmas. Todas las plantas sintomáticas fueron DAPI positivas (ver abajo). Por el contrario, las plantas de *L. esculentum* expuestas a la visita libre de insectos en dos ensayos independientes, no presentaron síntomas y fueron DAPI negativas. Así mismo, las plantas no expuestas a la visita de insectos no presentaron síntomas y fueron DAPI negativas.

Con el fin de determinar el órgano que presentaba mayor concentración de fitoplasmas en apio se hicieron análisis por DAPI, en estratos de la hoja y los folíolos estratificados (basal, medio y apical), además de raíces. La Figura 3 presenta el promedio de campos positivos en diferentes órganos de las tres plantas de apio evaluadas por DAPI. Los resultados indicaron que en todos los órganos (exceptuando hojas medias), cerca del 50% de los campos observados contenían un número bajo y entre el 10% y 38% de los campos observados se clasificaron como de rango alto. En las muestras provenientes de hojas medias, el porcentaje de campos de rango alto y rango bajo se acercó al 35%. Si se considera el número total de campos positivos (sumatoria de campos clasificados como rango alto y bajo) en todos los órganos, el porcentaje varió entre 61.7% y 80.6%. En consecuencia, según estos resultados la concentración de fitoplasmas es similar en los órganos evaluados, lo que sugiere que no hay una tendencia clara a acumularse en un órgano en particular.

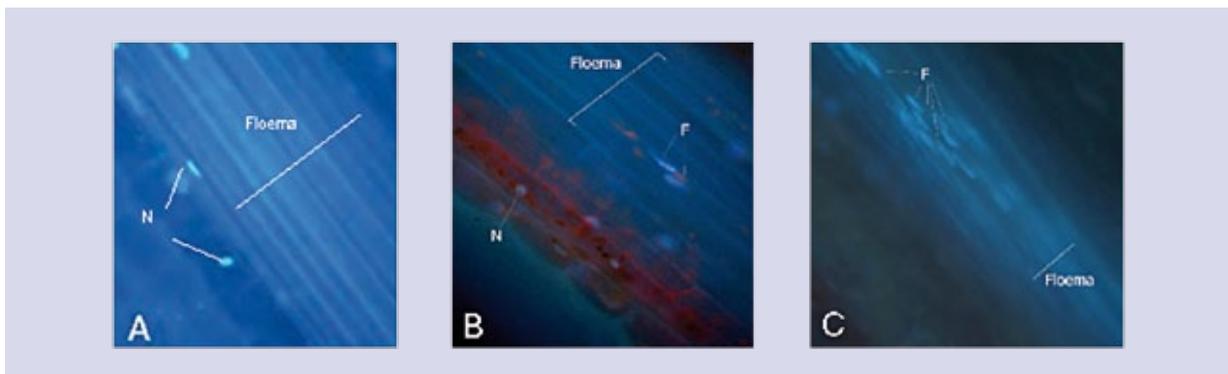


Figura 2. Microfotografías de secciones de floema de plantas de *A. graveolens* teñidas con DAPI, a 1600X. A. Muestra negativa. B. Muestra positiva con un número bajo de fitoplasmas. C. Muestra positiva con un número alto de fitoplasmas. F=fitoplasmas, N=núcleos de células vegetales.

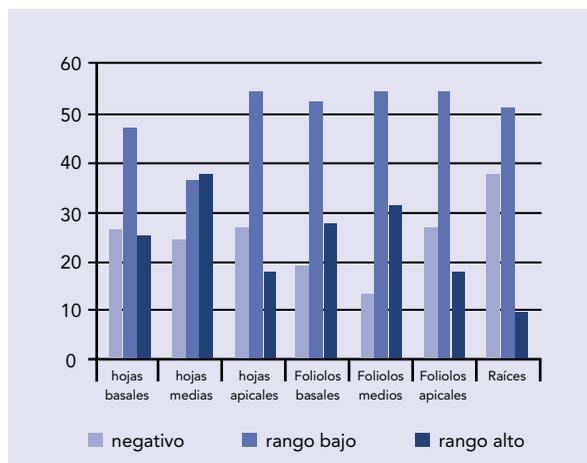


Figura 3. Promedio de campos positivos (en porcentaje) en diferentes órganos de *A. graveolens* de tres plantas evaluadas por DAPI. Negativo = campos sin fitoplasmas. Rango bajo = campos con 1 – 4 fitoplasmas. Rango alto = > 5 fitoplasmas. Para cada categoría se evaluaron 10 campos por planta, en tres plantas sintomáticas diferentes.

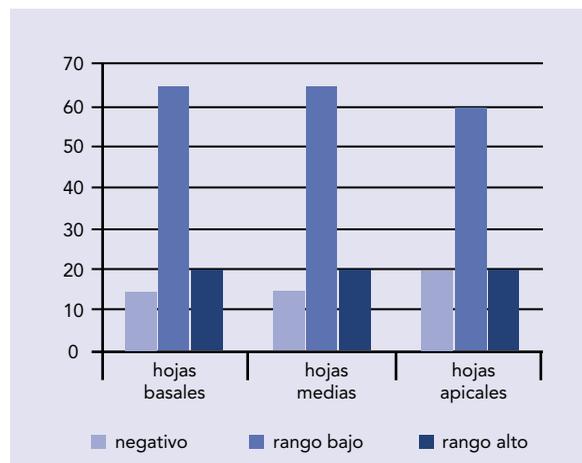


Figura 4. Promedio de campos positivos (en porcentaje) en hojas plantas de *N. tabacum* de tres plantas evaluadas por DAPI. Negativo = campos sin fitoplasmas. Rango bajo = campos con 1 – 4 fitoplasmas. Rango alto = > 5 fitoplasmas. Para cada categoría se evaluaron 10 campos por planta, en dos plantas sintomáticas diferentes.

Para *N. tabacum* no fueron evaluadas muestras de tallo y raíz debido a la imposibilidad de hacer cortes a mano alzada de estos tejidos. En un trabajo posterior se hicieron intentos por incluir tejidos vegetales en parafina para cortar con micrótopo, pero no fue posible obtener buenos cortes. En las dos plantas el número de campos con un alto número de fitoplasmas fue del 20% indicando que la mayoría de los campos positivos contenían de 1 a 4 manchas correspondientes a fitoplasmas. Se observó que en hojas basales, medias y apicales, la concentración de fitoplasmas era similar pues entre el 80 y 85% de los campos evaluados fueron positivos para la presencia de manchas (fitoplasmas), es decir no se observó una tendencia a la concentración en ninguno de los estratos (Figura 4).

En el caso de la única planta sintomática de *N. debneyi*, los análisis de DAPI mostraron que el 83.3% de los campos se clasificó en el rango bajo y el 3% en el alto. En este caso no se hizo un análisis

estratificado debido a que la planta era enana y todas las hojas crecían muy cerca del suelo.

Tal como en los casos anteriores, en las tres plantas de *F. uhdei* que se estudiaron se observó que la mayoría (entre 53% y 60%) de los campos provenientes de pecíolos de hojas de los diferentes estratos se clasificaron en el rango bajo de concentración de fitoplasmas. Solo entre el 0% y el 20% de los campos analizados, contenían un número de fitoplasmas superior a 5. No se observó una tendencia marcada a concentrar fitoplasmas en ninguno de los estratos de hojas evaluados.

Detección molecular de fitoplasmas

Algunas plantas de apio DAPI positivas, fueron evaluadas por métodos moleculares. Mediante PCR anidada usando cebadores para el gen 16SrRNA, se obtuvo un amplicón del tamaño esperado (940 bp) en las plantas expuestas, demostrando la presencia de fitoplasmas en estas

pero no en los controles no expuestos (Figura 6). Sin embargo, la cantidad de ADN obtenida no fue suficiente para secuenciar los productos de la amplificación. Adicionalmente, se hicieron separaciones de ADN total de plantas expuestas y no expuestas por electroforesis de campo pul-sado (Figura 7 A) y se hibridaron con una sonda no radioactiva de 1.245pb sintetizada a partir del gen 16SrDNA de fitoplasmas del grupo AshY de Bogotá. En la figura 7B se observa que la sonda se hibridó exclusivamente al ADN del tejido de apio expuesto a insectos (tanto raíces como parte aérea) (Carriles 1 y 2), pero no al ADN de la planta no expuesta. La intensidad de la señal es proporcional a la cantidad de ADN hibridado por la sonda y la mayor intensidad se detectó en el rango de 225- 680 Kb. Desafortunadamente, aunque se hicieron una gran cantidad de ensayos no se logró obtener bandas bien definidas.

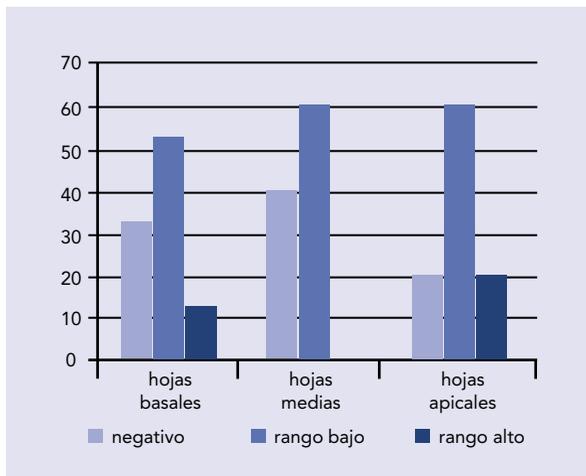


Figura 5. Promedio de campos positivos (en porcentaje) en hojas plantas de *F. uhdei* de tres plantas jóvenes evaluadas por DAPI. Estas plantas fueron infectadas por *Cuscuta* a partir de una planta de *F. uhdei* que había sido expuesta a la visita libre de insectos. Negativo = g< campos sin fitoplasmas. Rango bajo = campos con 1 – 4 fitoplasmas. Rango alto = > 5 fitoplasmas. Para cada categoría se evaluaron 10 campos por planta, en dos plantas sintomáticas diferentes.

DISCUSIÓN

Debido a la dificultad de estudiar los fitoplasmas del grupo Ash Y a partir su hospedero natural *F. uhdei*, surgió la necesidad de infectar otros hospederos vegetales que facilitaran su caracterización. Con este fin se escogieron especies que en la literatura se reportan como hospederos naturales de fitoplasmas tales como *A. graveolens* (Bosco et al., 1997; Kuske et al., 1991), *N. tabacum* (Marcone y Seemuller, 2001), *L. esculentum* (Pacros et al., 2006; Del serrone, 2001) y *N. debneyi*.

La presencia de fitoplasmas se constató mediante el test DAPI, una de las primeras metodologías empleadas para la detección de fitoplasmas (Seemuller, 1976; Jones, 2002; Sinclair et al., 1989; Sinclair et al., 1996; Sinclair et al., 1997), y si bien no permite la identificación de

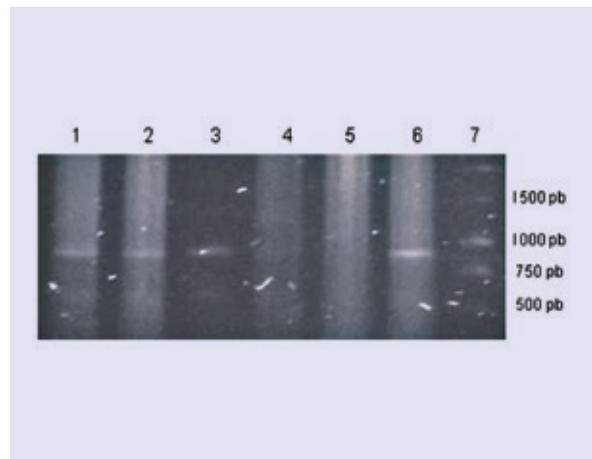


Figura 6. PCR anidada (primaria R16mF2/R16mR1; PhyRNAF3.3/R16R2) de muestras de *A. graveolens* expuestas a la visita libre de insectos. Carriles 1-4, extractos de ADN provenientes de muestras expuestas. Se observa una banda del tamaño esperado de 940 pb. Carril 5, control negativo planta no expuesta. Carril 6, control positivo plásmido con un inserto de 1700 pb correspondiente a un fragmento del gen 16S rRNA de la cepa AshY1 de Norteamérica. Se observa una banda del tamaño esperado de 940 pb. Carril 7, marcador de peso molecular 1Kb Ladder (Promega).

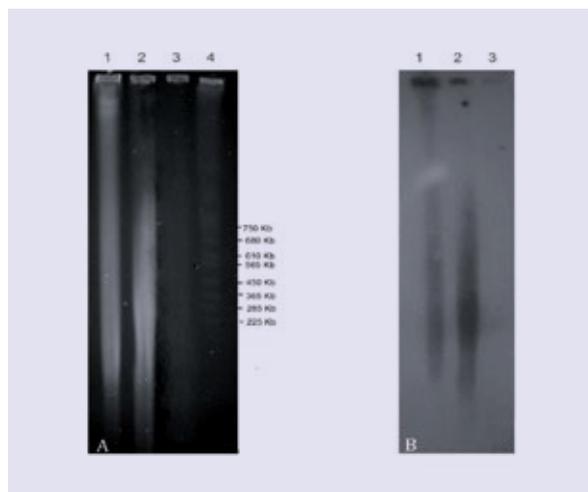


Figura 7. (A) Electroforesis de campo pulsado (Digestión con *Sma*I) tinción bromuro de etidio de extractos de plantas de apio expuestas y no expuestas. A. Carril 1 Apio expuesto parte aérea, Carril 2 Apio expuesto raíces, Carril 3 Control negativo planta no expuesta, Carril 4 marcador de peso molecular *S. cerevisiae* (Bio-Rad). B. Hibridación de ADN de gel de electroforesis en campo pulsado, sonda de 1245 pb región de gen 16S de fitoplasma. Carril 1 Apio expuesto parte aérea, Carril 2 Apio expuesto raíces, Carril 3 Control negativo planta no expuesta.

los fitoplasmas observados, el empleo de controles apropiados y un buen entrenamiento en la observación permite la detección de estos microorganismos. Bajo el microscopio, los fitoplasmas se observan como partículas (manchas) fluorescentes de color blanco azulado y de bordes poco definidos (Figura 2 A) en comparación a los núcleos celulares que se detectan como partículas bien delimitadas teñidas más intensamente (Figura 2 C). Si además las manchas se observan exclusivamente en los tubos del floema, se concluye que se trata de fitoplasmas. En este estudio, todas las plantas sintomáticas analizadas por DAPI fueron positivas, mientras que los controles no expuestos a la visita de insectos fueron negativos. Así mismo, las plantas de *L. esculentum* que no desarrollaron síntomas resultaron negativas por DAPI. Adicionalmente, se

estableció una escala semicuantitativa para hacer estimaciones relativas del número de fitoplasmas por campo, lo que permite hacer predicciones acerca de la concentración de estos microorganismos en distintos tejidos.

Cada especie vegetal puede tener diferente susceptibilidad a la inoculación con fitoplasmas y aunque la planta esté infectada con fitoplasmas, se han documentado casos en los cuales los insectos vectores no puede adquirir el patógeno ('Dead-end-host') (Weintraub y Beanland, 2006). Las plantas que presentaron mayor susceptibilidad a la infección por fitoplasmas fueron las de *A. graveolens*, mientras *N. tabacum* fueron moderadamente susceptibles, *N. debneyi*, susceptibilidad fue baja. Por otro lado, las plantas de *L. esculentum* expuestas no fueron infectadas a pesar de que se hicieron dos ensayos independientes (Tabla 2). El rango de hospedero de los fitoplasmas no depende solamente de la susceptibilidad de la especie a los fitoplasmas, sino también del resultado de la interacción vector-fitoplasma-planta (Griffiths *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 2000). En el caso de las plantas de *L. esculentum*, el ensayo realizado no permite establecer si la insusceptibilidad se debe a la imposibilidad fitoplasma de infectar la planta o el insecto, o la poca atracción del insecto por este hospedero. La moderada susceptibilidad de *N. debneyi* y *N. tabacum* también podría deberse a que dada la posibilidad de escoger otro hospedero, el insecto vector prefería otras especies vegetales.

Hasta donde tenemos conocimiento, los fitoplasmas del grupo 16SVII-A al cual pertenecen los fitoplasmas tipo Ash Y han sido reportadas principalmente en especies de Oleáceas en de los géneros *Fraxinus* y *Syringa* (Griffiths

et al., 1994), y en casos aislados en especies como *Hypericum perforatum* familia Hipericaceae (Bruni et al., 2005) en Europa, *Erigeron* sp. familia Compositae en Brasil (Barros et al., 2002), y experimentalmente en *Catharantus roseus* familia Apocynaceae (Hibben y Wolanski, 1971; López y Filgueira, 2006). En este trabajo se reporta que *A. graveolens* (familia Apiaceae), *N. tabacum* (familia Solanaceae) y *N. debneyi* (Familia Solanaceae) son hospederos de AshY, por lo menos en condiciones experimentales.

Además de explorar la posibilidad de infectar hospederos alternativos para los fitoplasmas Ash Y, este trabajo buscaba evaluar cual era el tejido con mayor concentración de fitoplasmas en el cual concentrar los esfuerzos para extracción de ADN. De las especies evaluadas, *A. graveolens* se presenta como un buen candidato a hospedero alternativo teniendo en cuenta su alta susceptibilidad a la infección y a que se trata de una planta herbácea, lo que podría facilitar la extracción de ADN. Sin embargo, en estas plantas tampoco se encontró ningún tejido con concentración de fitoplasmas marcadamente mayor dentro de los órganos evaluados (hojas y folíolos en estratos apical, medio y basal, y raíces) (Figura 3).

La presencia de fitoplasmas en las plantas de apio fue evidenciada mediante PCR anidada y por hibridación de extractos de ADN obtenidos por electroforesis de campo pulsado (PFGE). Estas pruebas demuestran la presencia de fitoplasmas pero en este trabajo no fue posible determinar el grupo al cual estos pertenecían. La técnica de PFGE se ha usado para visualizar los cromosomas completos de fitoplasmas (Neimark & Kirkpatrick, 1993; Marcone et al., 1999), también para determinar

mapas físicos cromosómicos y para obtener fracciones enriquecidas de ADN de fitoplasmas como paso previo en la construcción de librerías genómicas (Oshima et al., 2004; Bai et al., 2006; Tran-Nguyen et al., 2008). En este trabajo, aunque no se observó un patrón de bandeo claro en el gel de PFGE, pero, con la hibridación se evidenció que sólo a partir de tejido de apio proveniente de exposición a insectos se obtenía ADN reconocido por la sonda 16S rDNA de fitoplasmas.

El vector de los fitoplasmas del grupo Ash Y no es conocido ni en Colombia ni en Estados Unidos, a pesar de esfuerzos realizados en el pasado (Feeley et al., 2001; Hill & Sinclair, 2000; Orozco & Franco-Lara, 2005). Los resultados aquí presentados evidencian la transmisión de fitoplasmas a plantas experimentales sin usar un puente físico entre el floema de urapán y la planta receptora, sugiriendo que en Bogotá el insecto vector (o los insectos vectores) puede ser polífago, pues sería capaz de alimentarse y transmitir fitoplasmas a otras especies vegetales diferentes a *F. uhdei*, tales como *A. graveolens*, *N. tabacum* y *N. debneyi*. Evidencias adicionales muestran que en Bogotá, árboles de la especie *Liquidambar styraciflua* que coexisten con *F. uhdei* en avenidas y parques de Bogotá, también están infectadas con fitoplasmas del grupo Ash Y (Franco-Lara et al., 2010), lo que sugiere que este vector (o vectores) también se alimentan de esta especie.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad Militar Nueva Granada por la financiación recibida mediante el proyecto CIAS 2003-004.

BIBLIOGRAFÍA

1. Barros, T.S.L.; Davis, R.E.; Resende, R.O.; Dally, E. L. 2002. Erigeron Witches'-Broom Phytoplasma in Brazil Represents New Subgroup VII-B in 16S rRNA Gene Group VII, the Ash Yellows Phytoplasma Group. *Plant Disease* 86, 1142-1148.
2. Bosco, D; Minucci, C; Boccardo, G. and Conti, M. 1997. Differential acquisition of chrysanthemum yellow phytoplasma by three leafhopper species. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 83, 219-224.
3. Bruni, R; Pellati, F; Bellardi, M.G; Benvenuti, S; Paltrinieri, S; Bertaccini, A. and Bianchi, A. 2005. Herbal Drug Quality and Phytochemical Composition of *Hypericum perforatum* L. Affected by Ash Yellows Phytoplasma Infection. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 53, 964 -968.
4. Bai, X; Fazzolari, T. and Hogenhout, S. 2004. Identification and characterization of *TraE* genes of *Spiroplasma kunkelli*. *Gene* 336, 81-91.
5. Christensen, N.M; Axelsen, K.B; Nicolaisen, M. and Schulz, A. 2005. Phytoplasmas and their interaction with hosts. *Trends in Plant Science* 10, 526-535.
6. Del Serrone, P; Marzachì, C; Cragaloni, M. and Galeffi C. 2001. Phytoplasma infection of tomato in central Italy. *Phytopathologia Mediterranea* 40, 137-142
7. Doi, Y; Teranaka, M; Yora, K. and Asuyama H. 1967. Mycoplasma or PLT group-like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf potato witches's broom, aster yellows or paulonia witches' broom. *Annual Phytopathology Society Japan* 33, 259-266.
8. Feeley, C.J; Hart, E.R; Thompson, J.R. and Harrington, T.C. 2001. Occurrence, associates symptoms and potential insect vectors of the Ash Yellows phytoplasma in Iowa, U.S. *Journal of Arboriculture* 27, 331-340.
9. Filgueira, J.J; Franco-Lara, L; Salcedo, J.E; Gaitán S.L and Boa, E.R. 2004. Urapan (*Fraxinus uhdei*) dieback: a new disease associated with a phytoplasma in Colombia. *New Disease Reports. Plant Pathology* 53, 520.
10. Franco-Lara L. y Filgueira JJ. 2005. Síntomas de decaimiento del Urapán (*Fraxinus* sp) en Colombia. *Fitopatología Colombiana* 29, 32-38.
11. Franco-Lara, L; Contaldo, N; Martinez C; Calari, A; Paltrinieri, S; Duduk, B. and Bertaccini, A. 2010. Complex phytoplasma infection in declining liquidambar trees in Colombia. *Abstract Book 18th Congress International Organization for Mycoplasmaology, Chianciano Terme Italy July 2010.*
12. Gaitán, S.L. 2003. Detección y caracterización molecular de ftoplasmas tipo Ash Yellows en Urapanes de Bogotá. *Universidad Nacional de Colombia. Postgrado Interfacultades de Microbiología. Tesis de Maestría. Bogotá.*
13. Gundensen, D. E. and Lee, I. M. 1996. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathologia Mediterranea*. 35, 144-151.
14. Gundersen D.E; Lee I.-M; Rehner S.A; Davis R.E and Kingsbury D.T. 1994. Phylogeny of mycoplasma-like organisms (phytoplasmas):

- a basis for their classification. *Journal of Bacteriology* 176, 5244-5254.
15. Hearon S.S., Lawson R.H., Smith F.F., McKenzie J.T. and Rosen, J. 1976. Morphology of filamentous forms of a mycoplasma-like organism associated with hydrangea virescence. *Phytoplasma* 66, 608-616.
 16. Hibben C.R. and Wolanski, B. 1971. Dodder transmission of a mycoplasma from ash withches'-broom. *Phytopathology* 61: 151-156.
 17. Hill G.T. and Sinclair, W.A. 2000. Taxa of Leafhoppers Carrying Phytoplasmas at Sites of Ash Yellows Occurrence in New York State. *Plant Disease* 84, 134-138.
 18. Hogenhout SA, Oshima K, Ammar ED, Kizawa S, Kingdom HN, Namba, S. 2008. Phytoplasmas: bacteria that manipulate plants and insects. *Molecular Plant Pathology* 9, 403-423.
 19. Ishiie, T; Doi, Y; Yora, K and Asuyama, H. 1967. Suppressive effects of antibiotics of tetracycline group on symptoms development of mulberry dwarf disease. *Annals Phytopathological Society of Japan* 33, 267-275.
 20. Jones, P. *Phytoplasma Plant Pathogens*. In: *Plant Pathologist's Pocketbook*. 2002. CABI Publishing. 3rd Ed.
 21. Khan A.J; Botti S; Paltinieri, A.M; Al-Subhi and Bertaccini, A.F. 2002. Phytoplasmas in alfalfa seedlings: infected or contaminated seeds? En Abstracts 14 International Organization of Mycoplasma Conference, Viena, Austria.
 22. Kuske, C.R; Kirkpatrick, T.B; Seemuller, E. 1991. Differentiation of virescence MLOs using western aster yellows mycoplasma-like organism chromosomal DNA probes and restriction fragment length polymorphism analysis. *Journal of General Microbiology* 137, 153-159.
 23. Lee, I.M; Davis, R.E; Gundersen, D.E. 2000. Phytoplasma: Phytopathogenic Mollicutes. *Annual Review Microbiology*, 54: 221-255.
 24. Lee, I.M; Gundersen, D.E. y Bertaccini, A. 1998. Phytoplasma: ecology and genomic diversity. *Phytopathology*, 88: 1359-1366.
 25. Lee, I.M; Bertaccini, A. Vibio, M. and Gundersen, D.E. 1995. Detection and characterization of phytoplasmas in perennial fruit trees with decline symptoms in Italy. *Phytopathology* 85, 728-735.
 26. López K. y Filgueira, J.J. Infección y concentración de fitoplasmas tipo AshY en periwinkle (*Catharanthus roseus*), a partir de árboles de *Fraxinus* sp. infectados. 2006. *Revista Facultad de Ciencias Básicas* 2, 123-128.
 27. Marcone, C; Neimark, H; Ragozzino, A. and Seemuller, E. 1999. Chromosome sizes of phytoplasmas composing major phylogenetic groups and subgroups. *Phytopathology* 89, 805-810.
 28. Marcone C, and Seemüller E. 2001. A chromosome map of the European stone fruit yellows phytoplasma. *Microbiology* 147, 1213-1221
 29. Matteoni, J.A. and Sinclair, W.A. 1988. Elm yellows and Ash yellows. In *Tree Mycoplasma Diseases and Epidemiology*. Ed. C Hiruki. Pp 19-31. University Alberta Press.
 30. Neimark, H. and Kirkpatrick, B.C. 1993. Isolation and characterization of full-length chromosomes from non-culturable plant pathogenic Mycoplasma-like organisms. *Molecular Microbiology* 7, 21-28.

31. Orozco, M.L. y Franco-Lara, L. 2005. Ensayos de transmisión de fitoplasmas de Urapan (*Fraxinus* sp.) con el insecto *Tropidosteptes chapingoensis*. XXVI Congreso de ASCOLFI Bogotá-Colombia.
32. Oshima, K; Kakizawa, S; Nishigawa, H; Weiw, W; Susuki, S; Arashida, R; Nakata, D; Miyata, S-I; Ugaki; M Y Namba, S. 2004. Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of a plant-pathogenic phytoplasma. *Nature Genetics* 36, 27-29.
33. Pracros, 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* 19, 62-68.
34. Schneider, B; Torres, E; Martin, MP; Schroder, M; Behnke, H.D. and Seemüller, E. 2005. 'Candidatus Phytoplasma pini', a novel taxon from *Pinus silvestris* and *Pinus halepensis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55, 303-307.
35. Seemüller E. 1976. Investigations to demonstrate mycoplasma-like organisms in diseased plants by fluorescence microscopy. *Acta Horticulturae* 67, 109-112.
36. Sinclair, W.A; Luli, R.J; Dyer, A.T. and Larsen, A.O. 1989. Sampling and histological procedures for diagnosis of ash yellows. *Plant Disease* 73:432-435.
37. Sinclair, W.A. and Griffiths, H.M. 1994. Ash yellows and its relationship to dieback and decline of Ash. *Annual Review of Phytopathology* 32, 49-60.
38. Sinclair, W.A. y Griffiths, H.M. 2000. Variation in aggressiveness of Ash Yellows phytoplasmas. *Plant Disease*, 84:282-288.
39. Sinclair WA, Griffiths HM and Davis RE. 1996. Ash Yellows and Lilac Witches'-Broom: phytoplasmal diseases of concern in forestry and horticulture. *Plant Disease* 80, 468-475.
40. Sinclair, W.A; Griffiths, H.M. Y Whitlow, T.H. 1997. Comparisons of tolerance of ash yellows phytoplasmas in *Fraxinus* species and rootstocks-scion combinations. *Plant Disease*, 81:395-398.
41. Smart, C.D; Schneider, B; Blomquist, C.L; Guerra, L.J; Harrinson, N.A; Ahrens, U; Lorenz, K.H; Seemüller, E., and Kirkpatrick, B.C. 1996. Phytoplasma-specific PCR iniciadores based on sequences of 16S-23S rRNA spacer region. *Applied Environmental Microbiology*, 62: 2988-2993.
42. Tran-Nguyen, L.T.T; Kube, M; Schneider, B; Reinhardt, R. and Gibb, K.S. 2008. Comparative genome analysis of 'Ca. *Paustaliense*' (subgroup tuf-Australia I; rp-A) and 'Ca. *Phytoplasma asteris*' strains OY-M and AY-WB. *Journal of Bacteriology* 190, 3979-3991.
43. Weintraub, P.G. and Beanland, L. 2006. Insect vectors of phytoplasmas. *Annual review of Entomology* 51, 91-111