

# ESPECIES ARBÓREAS DE LAS FAMILIAS EUPHORBIACEAE, PITTOSPORACEAE Y SALICACEAE SON INFECTADAS POR 'CA. PHYTOPLASMA FRAXINI' Y 'CA. PHYTOPLASMA ASTERIS' EN INFECCIONES MIXTAS EN BOGOTÁ, COLOMBIA

Fecha de recepción: 4 de octubre de 2013 • Fecha de aceptación: 15 de noviembre de 2013

## TREE SPECIES OF EUPHORBIACEAE, PITTOSPORACEAE AND SALICACEAE FAMILIES ARE INFECTED BY 'CA. PHYTOPLASMA FRAXINI' AND 'CA. PHYTOPLASMA ASTERIS' IN MIXED INFECTIONS IN BOGOTA, COLOMBIA

Laura M. Perilla-Henao<sup>1</sup> • Liliana Franco-Lara<sup>2,3</sup>

### RESUMEN

La presencia de fitoplasmas del grupo 16SrI ('Ca. Phytoplasma asteris') fue reportada en *Croton* spp. (Euphorbiaceae), *Pittosporum undulatum* (Pittosporaceae) y *Populus nigra* (Salicaceae), en Bogotá. En este trabajo se reporta la existencia adicional de fitoplasmas del grupo 16SrVII 'Ca. Phytoplasma fraxini' en estas mismas especies de árboles ornamentales, por técnicas moleculares como PCR anidada, RFLP y secuenciación del gen 16SrRNA. Los resultados muestran la existencia de un complejo de fitoplasmas de los grupos 16SrI y 16SrVII que se asocian con síntomas como deformación general de la corona, ramas en copo, amarillamiento, elongación anormal de brotes apicales, escobas de bruja y rebrotación epicórmica que afectan el estado de sanidad de los árboles. En diciembre de 2013 la prevalencia sintomática en *Croton* spp., *P. undulatum* y *P. nigra* y se estimó en 36%, 93% y 85% respectivamente. Este trabajo presenta evidencia de que plantas de familias diferentes a Oleaceae que son susceptibles a fitoplasmas del grupo 16SrVII y que en este caso se encuentran en infecciones mixtas con fitoplasmas del grupo 16SrI. Se presentan evidencias de una enfermedad emergente de alta prevalencia en estas especies de árboles han pasado desapercibidas hasta la fecha, pero suponen un riesgo para la supervivencia de los árboles urbanos en Bogotá.

**Palabras clave:** *Croton* spp, *Pittosporum undulatum*, *Populus nigra*, árboles urbanos, gen 16srRNA, enfermedad emergente.

1 Joven Investigadora Universidad Militar Nueva Granada, Km 2 via Cajicá-Zipacquirá, Colombia

2 Docente Facultad de Ciencias Básicas y Aplicadas, Universidad Militar Nueva Granada, Km 2 via Cajicá-Zipacquirá, Colombia.

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

## ABSTRACT

The Presence of phytoplasmas of group 1SrI ('*Ca. asteris*') was reported in *Croton spp.* (Euphorbiaceae), *Pittosporum undulatum* (Pittosporaceae) and *Populus nigra* (Salicaceae) in Bogotá. This work reports the additional existence of phytoplasmas of the group 16SrVII ('*Ca. Phytoplasma fraxini*') in the same species of ornamental trees, by molecular techniques such as nested PCR, RFLP and sequencing of the 16SrRNA gene. These results show the existence of a complex of phytoplasmas of groups 16SrI and 16SrVII that is associated to symptoms such as general deformation of the crown, tufted foliage, yellowing, abnormal elongation of apical shoots, witches'-brooms and epicormic shoots that affect the health status of the trees. In December 2013 the symptomatic prevalence for *Croton spp.*, *P. nigra* and *P. undulatum* was estimated in 36%, 93% and 85% respectively. This work presents evidence in plants families different from Oleaceae that are susceptible to phytoplasmas of group 16SrVII and that in this case are found in mixed infections with phytoplasmas of group 16SrI. We present evidence of an emergent disease of high prevalence in these tree species that has passed unnoticed, but that represents a risk for the survival of the urban trees in Bogota.

**Keywords:** *Croton spp.*, *Pittosporum undulatum*, *Populus nigra*, urban trees, 16srRNA gene, emergent disease.

## INTRODUCCIÓN

Los fitoplasmas son bacterias pleomórficas, sin pared celular, de la clase *Mollicutes*, especializados en colonizar el floema de las plantas que infectan y transmitidos por vectores del suborden *Auchenorrhyncha* (Hemiptera). Los fitoplasmas comprenden un grupo monofilético altamente diverso (Lee et al., 2000; Weintraub y Beandland, 2006; Wei et al., 2007; Bertaccini y Duduk, 2009) y se diferencian de otros mollicutes en que son difícilmente cultivables (Contaldo et al., 2012). Su detección y clasificación se basa principalmente en el análisis de una región conservada del gen 16SrDNA (Gundersen et al., 1994; Sears and Kirkpatrick, 1994; Wei et al., 2007; Zhao et al., 2010) así como su detección e identificación depende de herramientas moleculares como PCR, PCR anidado, RFLP y secuenciación, principalmente de esta región (Lee et al., 1994; Lee et al., 1998; Seemüller et al., 1994; Seemüller et al., 1998). En la actualidad existen dos sistemas paralelos de clasificación, ambos

basados en el gen 16SrDNA. El primero establece los grupos a partir de patrones de corte de 17 enzimas de restricción en 32 grupos 16Sr RNA (Nejat et al., 2013). A su vez, cada grupo puede estar subdividido en subgrupos cuya determinación se complementa usando secuencias de otros genes como *rp* (proteínas ribosomales), *secY*, *tuf* y la región intergénica espaciadora 16S-23SrDNA, entre otros (Smart et al., 1996; Martini et al., 2007; Lee et al., 2006). El segundo sistema de clasificación es el taxonómico formal, que emplea el término '*Candidatus*' para referirse a especies bacterianas no cultivables. Se llama '*Candidatus (Ca.) Phytoplasma*' a una cepa portadora de una única secuencia de <1200 pb del gen 16SrDNA. Una cepa se considera una nueva especie si su secuencia 16SrDNA presenta una similitud menor a 97.5% respecto a secuencias previamente descritas (IRPCM, 2004). Se han propuesto 33 especies dentro del género *Ca. Phytoplasma* (Bertaccini y Duduk, 2009).

Los fitoplasmas se asocian a muchas enfermedades que producen amarillamiento del follaje y generan cambios morfológicos en la estructura de las plantas infectadas que dependen del tipo y edad de la planta hospedera, de la cepa de fitoplasma que coloniza, de la etapa de la enfermedad y de las condiciones ambientales (Lee et al., 2000). Los síntomas más comunes incluyen la formación de escobas de bruja, filodia (metamorfosis de órganos florales en hojas), virescencia (coloración verde de pétalos), elongación de tallos, formación de brotes en copos, enrojecimiento de hojas y tallos, enanismo, arrosamiento de las ramas, proliferación de brotes, amarillamiento, necrosis del floema y decaimiento (Bertaccini y Duduk, 2009). En plantas leñosas se pueden observar también síntomas como amarillamiento, enrojecimiento, hojas pequeñas, hojas entorchadas, aclaramiento de venas, alargamiento de venas, necrosis de venas, defoliación prematura, coloración de otoño prematura, frutos pequeños, crecimiento terminal pobre, follaje disperso, muerte regresiva ("dieback"), atrofia y decaimiento (Lee et al., 2000; Sinclair and Griffiths, 1994; Bertaccini y Duduk, 2009). Las plantas infectadas con fitoplasmas presentan cambios bioquímicos como el bloqueo en el transporte a través del floema, cambios en la translocación de fotosintatos, reducción en la tasa fotosintética, alteración del metabolismo secundario y perturbación del balance hormonal de las plantas (Christensen et al., 2005). Las desviaciones de la normalidad en la morfología de las especies estudiadas pueden atribuirse a desórdenes de los reguladores de crecimiento que se cree que son causados por los fitoplasmas. Existe poco conocimiento sobre los mecanismos de patogenicidad de los fitoplasmas, pero algunos resultados recientes indican que estos patógenos secretan en sus huéspedes efectores que afectan el metabolismo de las auxinas (Lee et al., 2000; Christensen et al., 2005 Bertaccini y Duduk, 2009).

Hasta comienzos de la década de 2000, se pensaba que los fitoplasmas del grupo 16SrVII (subgrupo 16SrVII-A) estaban restringidos a los géneros *Fraxinus* y *Syringa* de la familia Oleaceae exclusivamente en Norte América (Sinclair et al., 1996; Griffiths et al., 1999). El primer reporte de fitoplasmas 16SrVII-A fuera de Norte América fue hecho para *Fraxinus uhdei* en Colombia (Griffiths et al., 2001; Filgueira et al., 2004; Franco-Lara y Filgueira, 2005). Posteriormente, fitoplasmas del subgrupo 16SrVII-A fueron reportados en duraznero en Canadá (Zunnoon-Khan et al., 2010), vides en Chile (Longone et al., 2011) y en el arbusto *Ugni molinae* (Myrtaceae) y en la herbácea *Paeonia lactiflora* (Paenaciae) en Chile (Arismendi et al., 2011). Fitoplasmas de los subgrupos 16SrVII-B han sido reportados en *Erigeron* sp. en Brasil (Barros et al., 2002) y 16SrVII-C en alfalfa en Argentina (Conci et al., 2005). Fuera de América hay por lo menos un reporte de la presencia del grupo 16SrVII *Hypericum perforatum* en Europa (Bruni et al., 2005).

Generalmente, las enfermedades asociadas a fitoplasmas se asocian a un solo grupo de fitoplasmas, pero infecciones en las cuales están presentes varios grupos de fitoplasmas simultáneamente han sido descritas en algunos patosistemas. Por ejemplo en Australia tres grupos de fitoplasmas se encuentran infectando plantas de vid: 'Ca. Phytoplasma australiense' (CPA), tomato big bud phytoplasma (TBB) y Buckland Valley grapevine yellows phytoplasma (BVGY) (Gibb et al., 1999; Constable et al., 2002). Por otra parte, los grupos 16SrV y 16Sl se encuentran infectando vides en Italia (Alma et al., 1996), produciendo síntomas similares a los descritos en Australia. Potato purple top wilt (PPT) es una enfermedad devastadora que ocurre en varias regiones de Norte América y México donde al menos cuatro fitoplasmas de cepas distintas (16SrI, 16SrII and 16SrVI and XII) se han asociado con esta enfermedad (Leyva-López et al., 2002; Lee et al., 2006). Por otro lado, en Texas, Estados Unidos en cultivos como zanahoria, cebolla, perejil, eneldo y en varias

arvenses, en se encontraron fitoplasmas de los subgrupos 16SrI-A y 16SrI-B en combinaciones variadas y en algunos casos co-infectando la misma planta (Lee et al., 2003). En todos estos casos, el rango de severidad de los síntomas de las plantas afectadas era variable y no asociado con un grupo de fitoplasmas en particular. Además, las plantas hospederas infectadas por complejos de dos o más fitoplasmas no presentaban síntomas únicos ni más severos en comparación con las plantas infectadas con un solo fitoplasma (Gibb et al., 1999; Constable et al., 2002; De La Rue et al., 2001; Lee et al., 2006). Hasta donde sabemos, no se han reportado infecciones mixtas que involucran a fitoplasmas del grupo 16SrVII.

A inicios de la década de 2000, se demostró que los urapanes (*Fraxinus uhdei*, Oleaceae) de Bogotá presentaban síntomas como amarillamiento, defoliación, presencia de ramas muertas, muerte de ramas de la punta a la parte basal (dieback), decaimiento (decline), ramificación con hábito delicuescente, hojas pequeñas, ramas con hojas apretadas formando copos y rebrotación epicórmica, que se atribuyeron a fitoplasmas tipo Ash Yellows (Grupo 16SrVII) (Griffiths et al., 2001; Filgueira et al., 2004; Franco-Lara y Filgueira, 2005). El grupo de fitoplasmas 16SrVII también se asocia a las enfermedades "Ash Yellows" y "Lilac Witches'-broom" que afectan plantas de los géneros *Fraxinus* y *Syringa* en Norte América (Sinclair et al., 1996; Griffiths et al., 1999). Cuando se hicieron estos

reportes se consideraba que la fitoplasmosis de los de Urapanes de Bogotá era una enfermedad exótica que solo afectaba esta especie de árboles. Sin embargo, recientemente se ha demostrado la presencia de infecciones mixtas de fitoplasmas de los grupos 16SrI, 16SrV, 16SrVII y 16SrXII en liquidámbares sintomáticos de Bogotá (*Liquidambar styraciflua*, Hamamelidaceae) (Franco-Lara et al., 2010).

En árboles urbanos de Bogotá como sangregado (*Croton* spp.), jazmín del cabo (*Pittosporum undulatum*) y chopo *Populus nigra* la presencia de síntomas como deformación de las coronas, amarillamiento, defoliación, brotes epicórmicos, ramas en copo, ramificación delicuescente, etc. se ha asociado a la infección por fitoplasmas de grupo 16SrI (Perilla et al., 2012, Franco-Lara, 2013). El presente trabajo incluye análisis moleculares adicionales por RFLP y secuenciación de muestras de árboles sintomáticos de tres especies no oleáceas, en los cuales se detecta la presencia de fitoplasmas del grupo 16SrVII en infecciones mixtas con el grupo 16SrI.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal y estimación de la prevalencia

Este estudio se llevó a cabo en la ciudad de Bogotá D. C., Colombia, (Latitud Norte 4°35'56"57 y Longitud Oeste 74°04'51"30) a 2.630m sobre el nivel del mar. En diferentes fechas entre 2008 y 2011 se

El presente trabajo incluye análisis moleculares adicionales por RFLP y secuenciación de muestras de árboles sintomáticos de tres especies no oleáceas, en los cuales se detecta la presencia de fitoplasmas del grupo 16SrVII en infecciones mixtas con el grupo 16SrI.

tomaron muestras de hojas y ramas jóvenes, 6 individuos de *Croton sp.*, 5 de *P. undulatum* y 4 de *P. nigra*. Se seleccionaron árboles que presentaban deformaciones de la corona y la presencia de síntomas para cada individuo se reportó registrando su presencia a partir de una lista de síntomas que ocurren en árboles infectados con fitoplasmas (Sinclair y Griffiths, 1994; Sinclair et al., 1996; Boa, 2003). La lista de síntomas incluyó: deformación general de la corona, ramas en copo, entrenudos delicuescentes, pigmentación púrpura anormal de hojas y corona, amarillamiento, elongación anormal de brotes apicales, escobas de bruja, rebrotación, hojas pequeñas, rebrotación epicórmica, ramas muertas, virescencia y filodia.

La prevalencia se estimó como el número de árboles al azar (diferentes a los árboles en los cuales se detectaron los fitoplasmas) con más de tres síntomas sobre el total de árboles visitados en diciembre de 2013, en 6 localidades diferentes de Bogotá. Se evaluaron 33 árboles de *Croton spp.*, 15 de *P. nigra* y 20 de *P. undulatum*. Diferentes números de muestra reflejan los diferentes tamaños poblacionales de estas especies en los lugares visitados.

### Extracción de ADN

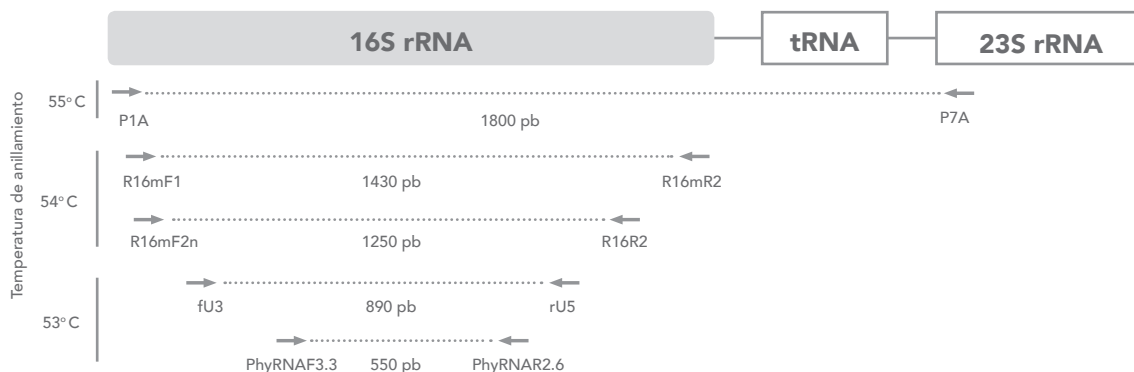
Para la extracción de ADN, las hojas y ramas se limpiaron superficialmente con agua y jabón, y se

desinfectaron superficialmente con etanol al 70%. El tejido fresco correspondiente a los haces vasculares se separó de la médula y la corteza, y se almacenó a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Para las extracciones se utilizó el método de Prince et al. (1993) partiendo de 1 g de tejido proveniente de los haces vasculares, previamente macerado en nitrógeno líquido. El ADN extraído se resuspendió en buffer TE y el ADN se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### Amplificación por PCR anidada

Con el objetivo de verificar la ausencia de sustancias inhibitoras de la PCR en los extractos de ADN vegetal, estos se usaron como molde en reacciones de PCR estándar (temperatura de alineación de  $53^{\circ}\text{C}$ ), con los iniciadores rpsF (5'-GTGGTAGAAAGCA-ACGTGCGACTT -3') y rpsR2 (5'-TGCGGATCGAACATCAATTGCAAC -3') (Oxelmann et al., 1997) que amplifican el intrón rps16 del genoma de cloroplasto. Los extractos libres de inhibidores generaban un producto de 800pb. Cuando no había amplificación, se realizaba un paso adicional de extracción mediante el Kit 'DNA Clean-Up' (MoBio®), siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

Para la detección de fitoplasmas, los extractos de ADN se amplificaron con iniciadores para el gen 16S rRNA, en reacciones de PCR anidadas. La reacción primaria se realizó con los iniciadores P1A/P7A (Lee



**Figura 1.** Ubicación de los iniciadores en el gen 16SrRNA usados para la detección de fitoplasmas por PCR anidada y temperatura de Anillamiento de los diferentes pares de iniciadores.

et al., 2004) y posteriormente se realizaron una o dos reacciones de PCR anidadas consecutivas usando los pares de iniciadores R16mF2/R16mR1 o R16F2n/R16R2 (Gundersen y Lee, 1996) en la primera anidada y posteriormente fU5/rU3 (Seemüller et al., 1994) o PhyrRNAF3.3/ PhyrRNAR2.6 (5'- AATAGTGGAAA-AACTATC-3' y 5'- TTTCTATAACTTTGCAGA-3' respectivamente) en la segunda PCR anidada (Figura 1). Las reacciones de PCR se llevaron a volumen final de 15 µl, con 0,05 U/ µL de Taq polimerasa (Bioline ®), buffer de la enzima 1X, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2mM de dNTPs (Bioline ®), 0.2µM de cada iniciador y 20-50 ng de ADN. En el caso de reacciones anidadas, el producto de la reacción primaria se diluyó 1:20 en agua y 2 µL de la dilución se usaron como molde. El perfil térmico usado fue: denaturación por 10 min a 94°C, 35 ciclos de denaturación a 94°C, 1 min alineamiento de los iniciadores dependiendo del par de iniciadores (Tabla 1), 2 min extensión a 72°C y un paso final de extensión por 10 min a 72°C. Los productos de PCR se separaron por electroforesis estándar en gel de agarosa al 1% y se tiñeron con bromuro de etidio. Como controles positivos para PCR se usaron extractos de ADN de varios fitoplasmas generosamente donados por el Dr. Nigel Harrison (Universidad de Florida, USA) y la Dra. Assunta Bertaccini (Universidad de Boloña, Italia). Amplicones obtenidos con diferentes combinaciones de iniciadores en PCR anidada se enviaron a secuenciar o se analizaron por RFLP

### **RFLP (Restriction Frangment Length Polymorphism)**

Amplicones seleccionados obtenidos con los iniciadores R16F2n/R16R2 se digirieron con las enzimas de restricción *AluI*, *RsaI* o *MseI* (New England Biolabs ®). En cada caso se prepararon reacciones a volumen final 20 µL con el buffer recomendado por el fabricante a una concentración final 1X y 0,05 U/µL de enzima, usando entre 5 y 7 µL del producto

de PCR. Todas las reacciones se incubaron durante 16 h a 37 °C. Los productos de la reacción de digestión se separaron en gel de agarosa al 3 o 3.5% en buffer TBE 1X y se visualizaron con tinción de bromuro de etidio y radiación UV.

### **Análisis de secuencias**

Amplicones seleccionados se purificaron del gel de agarosa con el Kit 'PCR Clean-up' (MoBio) y se enviaron a secuenciar en dos direcciones a Macro-gen ®, Corea. Las secuencias obtenidas se compararon mediante nBLAST (Basic Local Aligment Search Tool) (Altschul et al., 1990) con la base de datos GenBank y se verificaron manualmente con Chromas Lite 2.1.1 (Technelysium). Las secuencias se alinearon con su complemento reverso para producir secuencias consenso. Las secuencias se alinearon usando CLUSTALW (BioEdit versión 7.1.3) con secuencias de cepas representativas de diferentes grupos de fitoplasmas y de fitoplasmas reportados en Colombia. Posteriormente se construyeron dendogramas en MEGA versión 5 (Tamura et al., 2011) usando el algoritmo de distancia Neighbor-Joining y con un valor de 'bootstrap' de 1000 réplicas. El software iPhyClassifier (Zhao et al., 2009) se utilizó para determinar los coeficientes de similitud de los patrones de restricción con 17 enzimas de restricción, que permiten la determinación de subgrupos 16SrRNA.

## **RESULTADOS**

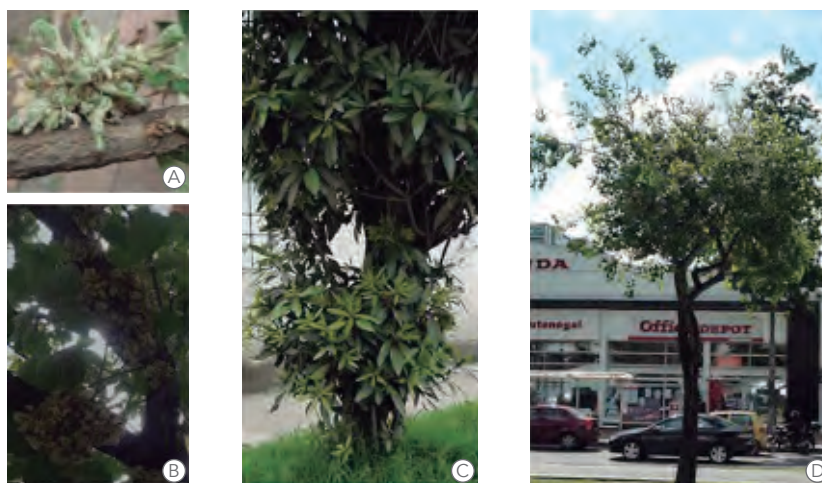
### **Síntomas de árboles y prevalencia**

Los árboles de los cuales se tomaron muestras para este trabajo mostraban cambios en la estructura de la corona o modificaciones sustanciales de los patrones de crecimiento normal. Los síntomas característicos de cada especie se resumen en la tabla 1. En todos los casos, los árboles presentaban al menos tres síntomas asociados con fitoplasmosis.

**Tabla 1.** Síntomas observados en árboles de diferentes especies

Síntomas	<i>Croton spp.</i>	<i>P. nigra</i>	<i>P. undulatum</i>
Deformación general de la corona		X	X
Brotos epicórmicos	X	X	X
Ramas en copo		X	X
Crecimiento anormal de brotes apicales	X	X	X
Escobas de bruja			X
Amarillamiento		X	X
"Hojillas"	X		
Tejido vascular necrosado	X		
<sup>1</sup> Prevalencia	12/33 36%	14/15 93%	17/20 85%

<sup>1</sup> Prevalencia estimada como el número de árboles con más de tres síntomas sobre el total de árboles visitados en diciembre de 2013, en 6 localidades diferentes de Bogotá.



**Figura 2.** Síntomas de fitoplasmosis en las tres especies de árboles estudiadas. A detalle de "hojillas" en *Croton spp.*, B. "hojillas" cubriendo las ramas de *Croton spp.*, C. Rebrote epicórmico en la base del tronco de *P. undulatum*, y D. *P. nigra* con deformación de la corona causada por elongación anormal de algunos brotes apicales.

Los árboles *P. undulatum* y *P. nigra* presentaron coronas con arquitectura atípica, generalmente causada por la presencia de elongaciones anormalmente largas de los brotes apicales, ramas en copo (ramas con entrenudos cortos que hacen que las hojas tengan la apariencia de estar muy juntas) o escobas de bruja (generación de muchas ramas a partir de un único punto de crecimiento) y amarillamiento, que en cada especie toma una forma diferente. Otro síntoma muy evidente fueron los brotes epicórmicos (brotes con hojas que emergen del tronco o de ramas viejas en lugares donde no debería haber

brotación). Por otro lado, los síntomas en *Croton* spp. son un poco diferentes pues no se observaron deformaciones marcadas de la corona, pero sí "hojillas" (estructuras similares a hojas pequeñas, engrosadas, con desarrollo excesivo de tricomas que cubren los troncos y ramas de los árboles afectados), machas necróticas del tejido vascular y brotes epicórmicos en tronco y ramas (Figura 2).

En este trabajo se realizó una estimación preliminar de la prevalencia de fitoplasmosis en las tres especies en estudio en Bogotá. Se visitaron 6 zonas de la ciudad donde se registró la presencia o

**Tabla 2.** Resumen de resultados de PCR anidada y secuencias reportadas para el grupo 16SrVII

Especie	R16F2n/ R16R2	fU5/rU3	PhyRNA3.3/ PhyRNA2.6	Grupo 16SrRNA RFLP <sup>1</sup>	Número de accesión <sup>2</sup> de secuencias del grupo 16SrVII
<i>Croton</i> spp.	CB1	+	-	-	I, VII, I / VII HG764348
	CB2	+	+	+	
	CB3	+	+	-	
	CB4	-	-	-	
	CB5	+	-	-	
	CB6	-	-	-	
<i>P. nigra</i>	PN1	+	-	+	I, I / VII HG764355
	PN2	-	-	-	
	PN3	-	-	-	
	PN4	-	+	-	
<i>P. undulatum</i>	PU1	-	-	-	I, VII
	PU2	+	-	-	
	PU3	+	-	-	
	PU4	-	-	-	
	PU5	-	-	-	

El signo (+) indica bandas del tamaño esperado obtenidas por PCR anidada. El signo (-) ausencia de banda en el gel de electroforesis.

<sup>1</sup> El grupo 16SrRNA de fitoplasmas se estableció por RFLP y/o secuenciación. El símbolo (I) denota los casos en los que hay evidencia de infecciones mixtas en el mismo árbol.

<sup>2</sup> Número de Acceso a GenBank



**Tabla 3.** Identidad de secuencias de fitoplasmas del grupo 16SrVII de Bogotá comparado con una secuencia de referencia de *Fraxinus* de Norte América

Especie	Secuencias colombianas	Puntaje máximo	Puntaje total	Cobertura de la secuencia	Valor E	Identidad	Secuencia 16SrVII de Norte América
<i>Croton spp</i>	HG764348	1003	1003	100%	0.0	100%	
<i>P. nigra</i>	HG764355	981	981	99%	0.0	99%	JQ868445.1
<i>F. uhdei</i>	AY687786*	1698	1698	100%	0.0	100%	

\*Secuencia obtenida en un trabajo anterior

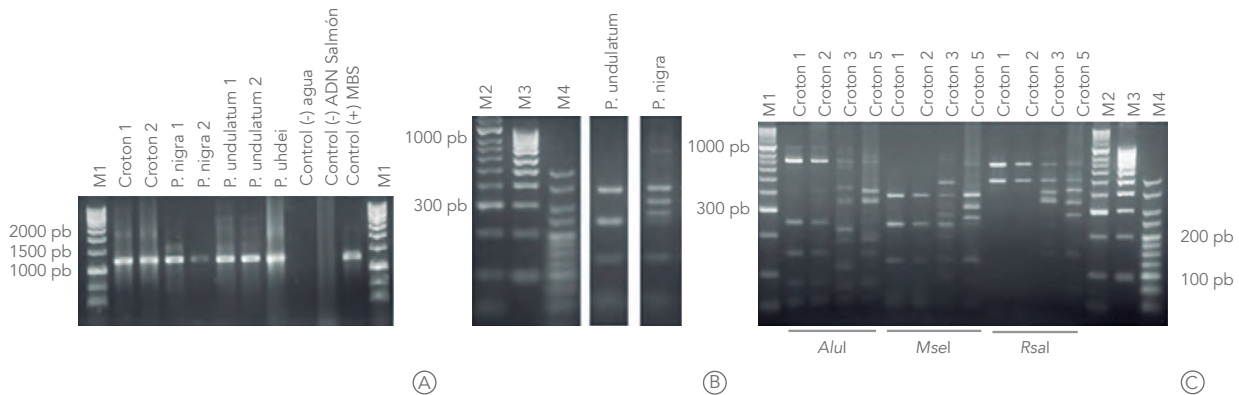
ausencia de síntomas en árboles escogidos al azar. La prevalencia encontrada fue del 36% para *Croton spp.*, 93% para *P. nigra* y 85% para *P. undulatum*.

**Detección de fitoplasmas**

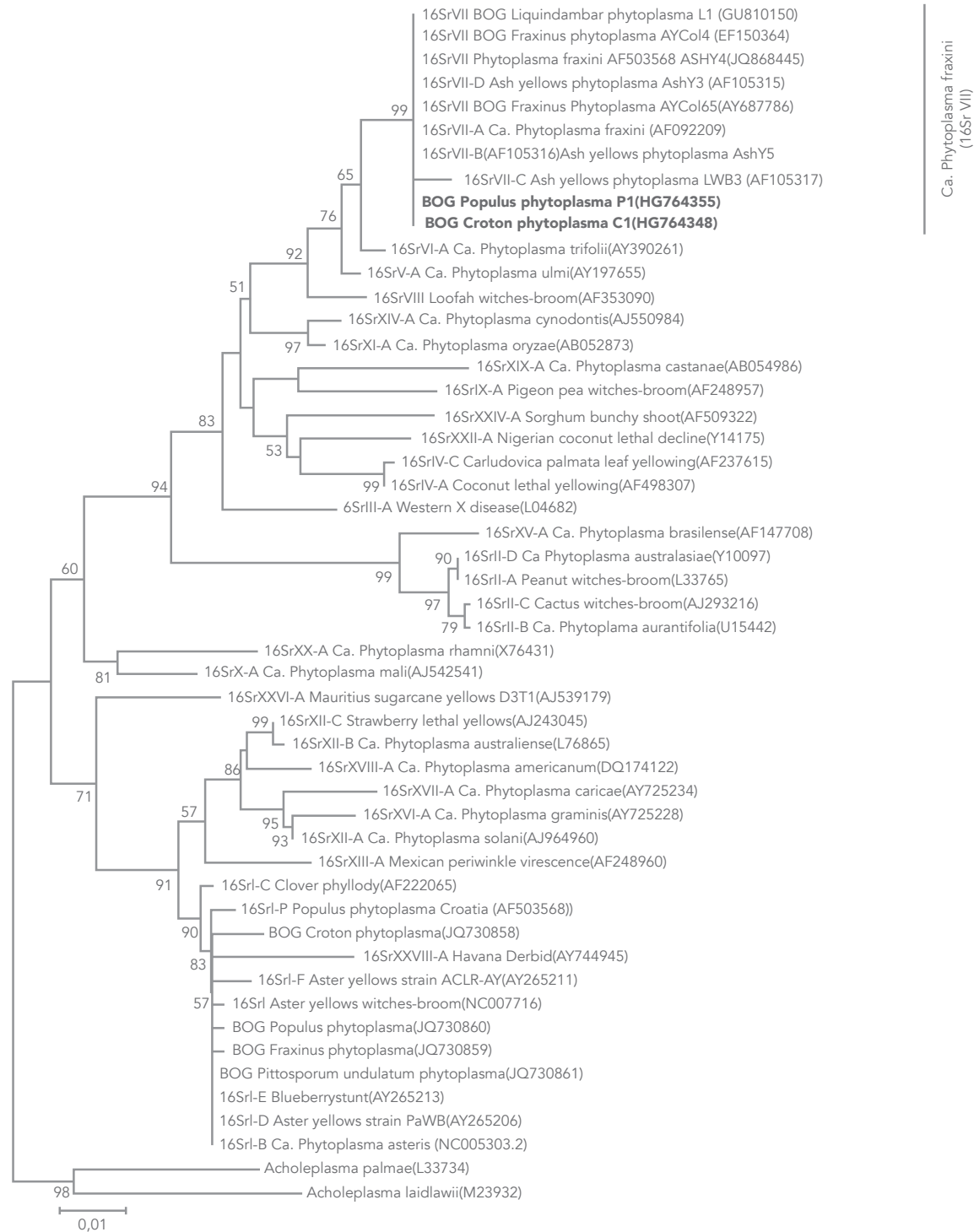
Las muestras fueron evaluadas por PCR anidada con P1A/P7A seguido por R16F2n/R16R2. En algunos casos cuando se obtuvieron amplificaciones inespecíficas o las bandas no fueron visibles por electroforesis, se realizó una reacción subsiguiente con fU3/rU5 y/o con PhyRNA3.3/PhyRNA2.6 (Tabla 2). En todos los casos en los que se utilizaron tres pares de iniciadores consecutivos la presencia de fitoplasmas se

confirmó por secuenciación y/o RFLP de la región R16F2n/R16R2. En todas las especies evaluadas se detectó por PCR anidada la presencia de fitoplasmas (Tabla 2, Figura 3 A).

Para determinar los grupos a los que pertenecían los fitoplasmas detectados, los amplicones obtenidos con los iniciadores R16F2n/R16R2 se analizaron por RFLP (Figuras 3B y 3C) y por secuenciación; además amplicones obtenidos con otras combinaciones de iniciadores se enviaron a secuenciar (Tabla 2). La presencia de ‘Ca. Phytoplasma asteris’ (16SrI) había sido reportada anteriormente por secuenciación para todas las especies,



**Figura 3.** Detección molecular de fitoplasmas en árboles de Bogotá. A. PCR anidada de muestras de *Croton* spp., *P. undulatum* y *P. nigra* con iniciadores P1A/P7A seguido por R16F2n/R16R2. B. Ejemplo de patrones de RFLP del amplicón R16F2n/R16R2 de *P. nigra* y *P. undulatum*, digerido con *Mse*I. C. Cambiar la letra. Patrones de RFLP de amplicones R16F2n/R16R2 de cuatro individuos de *Croton* spp. obtenidos con *Alu*I, *Mse*I y *Rsa*I.



**Figura 4.** Dendrograma construido por el método Neighbor Joining (Bootstrap 1000) de la región 16SrRNA (505 posiciones) de fitoplasmas encontrados en *P. nigra* y *Croton* spp. de Bogotá. En negrilla se señalan las secuencias de fitoplasmas reportadas en este trabajo.

pero en este caso se obtuvo evidencia por RFLP por la presencia de patrones de restricción específicos (Figura 3B y 3C). Además, se detectó la presencia de 'Ca. *Phytoplasma fraxini*' (16SrVII) en muestras de las tres especies por RFLP y en *Croton* spp. y *P. nigra* por secuenciación. Un ejemplo es el gel presentado en la Figura 3B donde se observó la presencia de fitoplasmas del grupo 16SrVII en muestras *P. undulatum* y de los grupos 16SrI y 16SrVII simultáneamente en *P. nigra*. El gel que se presenta en la figura 3C presenta los resultados obtenidos en cuatro muestras de *Croton* spp. diferentes, digeridas con tres enzimas de restricción. Las muestras 1 y 2 estaban infectadas con el grupo 16SrVII y la muestra 5 con 16SrI y 16SrVII simultáneamente. El caso de la muestra *Croton* 3 es más complejo porque se encontró infectada con 16SrVII pero además se observaron otras bandas inespecíficas que podrían corresponder a otro grupo de fitoplasmas o la amplificación de otra bacteria.

Las secuencias obtenidas a partir de las diferentes especies de árboles se presentan en la Tabla 2. Cuando las secuencias obtenidas en *Croton* spp. y *P. nigra* fueron comparadas mediante BLAST con secuencias de NCBI se encontró que mostraban una identidad de más del 99% con secuencias del subgrupo 16SrVII-A de *Fraxinus* de Norte América, así como con una secuencia anteriormente obtenida de *F. uhdei* de Bogotá (Tabla 3). Los coeficientes de similitud de RFLP

de secuencias de 505 nucleótidos fueron del 100% al comparar una secuencia de referencia de *Fraxinus* de Norte América (JQ868445.1) con las dos secuencias de fitoplasmas de *Croton* spp. (HG764348) y *P. nigra* (HG764355) reportadas en este trabajo. El dendograma construido incluyendo estas confirma la altísima identidad de los aislados 16SrVII-A de Bogotá y de Norte América (Figura 4). En resumen, la presencia de fitoplasmas de grupo 16SrVII fue demostrada o por secuenciación o por RFLP en individuos de *Croton* spp. *P. undulatum* y *P. nigra*.

## DISCUSIÓN

El presente trabajo presenta evidencia de la existencia de fitoplasmas *Ca. Phytoplasma fraxini*' subgrupo 16SrVII-A en Bogotá, infectando árboles de *Croton* spp., *P. nigra* y *P. undulatum* obtenida por PCR anidada (Figura 3 A), secuenciación (Tablas 2 y 3, Figura 4) y RFLP (Figuras 3B y 3C) en los mismos árboles en los cuales en un trabajo anterior se demostró la presencia de fitoplasmas del grupo 16SrI (Perilla et al., 2012, Franco-Lara, 2013). Los resultados presentados en este trabajo indican que frecuentemente los fitoplasmas del grupo 16SrVII se encuentran en infecciones mixtas con fitoplasmas del grupo 16SrI en los árboles evaluados.

Una primera fuente de evidencia que sugiere la presencia de fitoplasmas en *Croton* spp., *P. nigra* y

Los resultados presentados en este trabajo indican que frecuentemente los fitoplasmas del grupo 16SrVII se encuentran en infecciones mixtas con fitoplasmas del grupo 16SrI en los árboles evaluados.

En el caso de las infecciones asociadas a fitoplasmas, se observa que en la misma planta hospedera diferentes grupos de fitoplasmas produzcan síntomas similares. Es más, plantas con infecciones mixtas no parecen tener síntomas diferentes o más agresivos que plantas infectadas con un solo fitoplasma.

*P. undulatum* provino de la observación de los síntomas en individuos de estas especies. En *P. nigra* y *P. undulatum*, se observaron deformaciones de la corona debidas a la presencia de ramas en copo, elongación anormal de brotes apicales, escobas de bruja, así como amarillamiento y rebrotación epicórmica. En los árboles de *Croton* spp. no se observaron deformaciones de la corona, pero sí la presencia de "hojillas", estructuras atípicas en forma de hoja que recubren ramas y tronco, brotes epicórmicos, crecimiento anormal de brotes apicales y necrosis del tejido vascular. Síntomas como estos han sido descritos para árboles ornamentales de otras especies (Sinclair y Griffiths, 1994; Sinclair et al., 1996; Boa, 2003; referencia web 1, referencia web 2 y referencia web 3). Los síntomas asociados a fitoplasmas en plantas, son atribuidos por una parte al taponamiento del floema y por otra parte al desarreglo de los reguladores de crecimiento (Lee et al., 2000; Christensen et al., 2005 Bertaccini y Duduk, 2009). Los mecanismos por los cuales los fitoplasmas afectan la morfología de las plantas, están en estudio. Un caso caracterizado es en la cepa OY de "Ca. P. asteris" donde se evaluó la función de una proteína fitoplásmica de 4.5 kDa (TENGU) y se encontró que es capaz de suprimir la respuesta de la planta a las auxinas, lo que induce morfología anormal como escobas de bruja y enanismo (Hoshi et al., 2009).

En el caso de las infecciones asociadas a fitoplasmas, se observa que en la misma planta hospedera

diferentes grupos de fitoplasmas produzcan síntomas similares. Es más, plantas con infecciones mixtas no parecen tener síntomas diferentes o más agresivos que plantas infectadas con un solo fitoplasma (Gibb et al., 1999; Constable et al., 2002; De La Rue et al, 2001; Lee et al., 2006). En este caso, los árboles afectados estaban infectados por un complejo de fitoplasmas de los grupos 16SrI y 16SrVII pero la contribución de cada grupo individual de fitoplasmas en la generación de los síntomas y los efectos para la transmisión por los insectos vectores, evolución y adaptación a nuevos hospederos es desconocida.

Las secuencias obtenidas en este trabajo que provienen de árboles de *Croton* spp. y de *P. nigra* pertenecen al subgrupo 16SrVII-A y tienen similitudes superiores al 99% y coeficientes de identidad por RFLP del 100% comparadas con secuencias previamente reportadas en *F. uhdei* de Bogotá y de *Fraxinus* de Norteamérica (Tabla 3). El urapán *F. uhdei* es una especie nativa de Centro América, introducida en Bogotá según parece en la década de 1950 y que de hecho, en muchos libros aparece erróneamente identificada como *F. chinensis* (E. Wallander, (año) comunicación personal, County Administrative Board, Jönköping, Suecia). Desafortunadamente la historia precisa de la importación de los *F. uhdei* a Bogotá se ha perdido, pero se sugiere que fueron traídos en forma de esquejes de Norte América y no de China como generalmente se cree. Los resultados de este trabajo apoyan

la idea de que los fitoplasmas del grupo 16SrVII detectados en Colombia vinieron en los *F. uhdei* importados de Norteamérica, de donde se dispersaron a especies de géneros distintos a Oleáceae, como *Croton* spp., *P. undulatum*, *P. nigra* y *Liquidambar styraciflua* conquistando nuevos nichos (Franco-Lara et al., 2010).

La dispersión de los fitoplasmas en la naturaleza depende de la capacidad de los insectos vectores para transmitirlos de plantas infectadas a plantas sanas. Hasta hace poco no existían reportes de vectores de fitoplasmas del grupo 16SrVII (Hill y Sinclair, 2000, Feeley et al., 2001). Sin embargo un estudio realizado recientemente por nuestro grupo encontró que dos especies de insectos de la familia Cicadellidae, géneros *Exitianus* y *Amplipcephalus* eran capaces de transmitir experimentalmente fitoplasmas del grupo 16SrVII a plantas de frijol (Perilla, 2013; resultados en publicación). Por otro lado, un estudio anterior demostró la inoculación experimental de fitoplasmas de *F. uhdei* a plantas herbáceas como *Apium graveolens* (Apiaceae), *Nicotiana tabacum* y *N. debneyi* (Solanaceae), colocando las plantas herbáceas en las ramas del árbol y permitiendo la visita no controlada de insectos. Además de determinar que las herbáceas eran susceptibles a fitoplasmas, se demostró que los insectos vectores eran capaces de alimentarse también de otras plantas, presentando la primera evidencia de la existencia de insectos vectores polípagos (Perilla et al., 2010).

En su conjunto, estos resultados sugieren que el grupo 16SrVII no es un patógeno exclusivo de la familia Oleaceae y que en presencia de un vector apropiado es capaz de infectar otras familias de

plantas. Las observaciones hechas por nuestro grupo y por el Jardín Botánico José Celestino Mutis (J. A. Castro (2012), comunicación personal) indican que por lo menos para *Croton* spp. y para *P. undulatum*, los síntomas asociados a fitoplasmosis son recientes, no observados antes de 2007. Entonces, las fitoplasmosis en estos árboles puedan ser consideradas enfermedades emergentes, que no existían hasta hace pocos años. En la actualidad no existe una explicación a la reciente aparición de estas nuevas enfermedades en la ciudad, pero estos resultados ponen de manifiesto la grave situación fitosanitaria de los árboles de Bogotá y la necesidad de estudiar la epidemiología de estas enfermedades para disminuir su impacto y la creciente dispersión a otras especies ornamentales de interés comercial en la ciudad y sus alrededores. Hasta donde sabemos, este es el primer reporte de infecciones mixtas en las que participa el grupo 16SrVII; la existencia de estas infecciones indica que en Bogotá existen insectos vectores para los dos grupos de fitoplasmas lo que implica un alto riesgo de infección a otras especies de plantas.

## AGRADECIMIENTOS

Las autoras agradecen al José Arnulfo Castro del Jardín Botánico de Bogotá José Celestino Mutis por compartir sus observaciones acerca de los síntomas presentes en árboles de *Croton* spp, de Bogotá, así como a la Dra Assunta Bertaccini y al Dr Nigel Harrison por habernos donado ADN control para los ensayos de PCR anidada. También a la Universidad Militar Nueva Granada por la financiación del proyecto CIAS 550.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Alma A., Davis R.E., Vibio M., Danielli A., Bosco D., Arzone A. y Bertaccini A. 1996. Mixed infection of grapevines in northern Italy by phytoplasmas including 16S rRNA RFLP subgroup 16Srl-B strains previously unreported in this host. *Plant Disease* 80, 418-421
2. Altschul S.F., Gish W, Miller W, Myers E.W. y Lipman D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215,403-410.
3. Arismendi N, González F, Zamorano A., Yrade N., Pino A.M. y Fiore N. 2011. Molecular identification of "*Candidatus Phytoplasma fraxini*" in murta and peony in Chile. *Bulletin of Insectology* 64, S95-S96.
4. Barros T.S.L., Davis R.E., Resendeye R.O. y Dally E.L. 2002. Erigeron witches' broom phytoplasma Yellow's Phytoplasma Group. *Plant Disease* 86, 1142-1148.
5. Bertaccini A. y Duduk B. 2009. Phytoplasma y phytoplasma diseases: a review of recent research. *Phytopathologia Mediterranea* 48, 355-378.
6. Boa E. 2003. An illustrated guide to the state of health of trees Recognition y interpretation of symptoms y damage. CABI Bioscience.
7. Bruni R., Pellati F., Bellardi M.G., Benvenuti S., Paltrinieri S., Bertaccini A., Bianchi A. 2005. Herbal drug quality y phytochemical composition of *Hypericum perforatum* L. affected by ash yellows phytoplasma infection. *Journal of Agricultural y Food Chemistry* 53, 964-968.
8. Conci L., Meneguzzi N., Galdeano E., Torres L., Nome C. y Nome S. 2005. Detection y molecular characterisation of an alfalfa phytoplasma in Argentina that represents a new subgroup in the 16S rDNA ash yellows group ('*Candidatus Phytoplasma fraxini*'). *European Journal of Plant Pathology* 113,255-265.
9. Constable, F.E., Whiting, J.R., Jones, J., Gibb K.S. and Symons R.H. 2002 A new grapevine yellows phytoplasma from the Buckland Valley of Victoria, Australia. *Vitis* 41, 147-154.
10. Christensen N.M., Axelsen K.B., Nicolaisen M. y Schulz A. 2005. Phytoplasmas and their interactions with hosts. *Trends in Plant Science* 10, 526-535.
11. Contaldo N., Bertaccini A., Paltrinieri S., Windsor H. M. y Windsor G. D. 2012. Axenic culture of plant pathogenic phytoplasmas. *Phytopathologia Mediterranea* 51, 607-617
12. De la Rue, S., Padovan, A. and Gibb, K. 2001. *Stylosanthes* is a Host for Several Phytoplasmas, One of which Shows Unique 16S-23S Intergenic Spacer Region Heterogeneity. *Journal of Phytopathology* 149, 613-619.
13. Feeley C.H., Hart E.R., Thompson J.R. Y Harrington T.C. 2001. Occurrence, associated symptoms y potential insect vectors of the Ash yellows phytoplasma in Iowa, U.S. *Journal of Arboriculture* 27, 331-340.
14. Filgueira JJ, Franco-Lara L., Salcedo JE. Gaitan SL, Boa ER, 2004. Urapán (*Fraxinus udhei*) dieback a new disease associated with a

- phytoplasma in Colombia. The British Society for Plant Pathology. New Disease Reports 9, 6.
15. Franco-Lara L. y Filgueira J.J. 2005. Síntomas de decaimiento del Urapán (*Fraxinus* sp.) en Colombia. Fitopatología Colombiana 29, 32-38.
  16. Franco-Lara L., Contaldo N., Martínez C., Calari A., Paltrinieri S., Duduk B., 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.
  17. Franco-Lara L. 2013. Identification of phytoplasmas infecting native and introduced tree species in Bogota, Colombia. Phytopathology 103, S2.46.
  18. Gibb, K.S., Constable, F.E., Moran, J.R. and Padovan A.C. 1999. Phytoplasmas in Australian grapevines - detection, differentiation and associated diseases. Vitis 38, 107-114.
  19. Griffiths H.M., Boa E.R. y Filgueira J.J. 2001. Ash yellows disease of *Fraxinus chinensis* in Colombia. Phytopathology 91, S32-S33
  20. Griffiths H.M., Sinclair W.A., Smart D.C. y DAVIS R.E. 1999. The phytoplasma associated with ash yellows y lilac witches'-broom: '*Candidatus* Phytoplasma *Fraxini*'. International Journal of Systematic Bacteriology 49, 1605-1614.
  21. Gundersen D.E., Lee I.M, REHNER SA, DAVIS, RE y KINGSBURY DT. 1994. Phylogeny of mycoplasma-like organisms (phytoplasmas): a basis for their classification. Journal of Bacteriology 176, 5244-5254.
  22. Gundersen D.E. y Lee I.M. 1996. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal initiator pairs. Phytopathology Mediterranea 35, 144-151.
  23. Hill G.T. y Sinclair W.A. 2000. Taxa of leafhoppers carrying phytoplasmas at sites of Ash Yellows occurrence in New York State. Plant Disease 84, 134-138.
  24. Hogenhout S.A., Oshima K., Ammar E.D., Kakizawa S., Kingdom H.N. y Namba S. 2008. Phytoplasmas: bacteria that manipulate plants y insects. Molecular Plant Pathology 9, 403-423.
  25. Hoshi A., Oshima K., Kakizawa S., Ishiia Y., Ozeki J., Hashimoto M., Komatsu K., Kagiwada S., Yamaji Y. y Namba S. 2009. A unique virulence factor for proliferation and dwarfism in plants identified from a phytopathogenic bacterium. PNAS 106, 6416-6421.
  26. IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team-Phytoplasma, 2004. '*Candidatus* Phytoplasma', a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonise plant phloem y insects. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 54, 1243-1255.
  27. Lee, I.M., Bottner, K.D., Secor, G. y Rivera-Varas. V. 2006. '*Candidatus* Phytoplasma *americanum*', a phytoplasma associated with a potato purple top wilt disease complex. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 56, 1593-1597.
  28. Lee I-M., Davis R.E. y Gundersen-Rindal D.E. 2000. Phytoplasma: Phytopathogenic

- Mollicutes. *Annual Review Microbiology* 54, 211-55.
29. Lee I.M., Danielli A., Bertaccini A., Vibio M. y Bartoszyk I.M. 1996. Multiple phytoplasmas detected in two species of Homoptera feeding on pear trees with decline symptoms. *International Organization Mycoplasmaology Letter* 4: 199.
  30. Lee I.M., Gundersen D.E., Hammond R.W. y Davis R.E. 1994. Use of mycoplasma-like organism (MLO) group-specific oligo-nucleotide primers for nested-PCR assays to detect mixed-MLO infections in a single host plant. *Phytopathology* 84, 559-566.
  31. Lee I.M., Gundersen-Rindal D.E., Davis R.E. y Bartoszyk I.M. 1998. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analysis of 16S rRNA y ribosomal protein gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48, 1153-1169.
  32. Lee I.M., Gundersen-Rindal D.E., Davis R.E., Bottner K.D., Marcone C. y Seemuller E. 2004. '*Candidatus Phytoplasma asteris*', a novel phytoplasma taxon associated with aster yellows y related diseases. *International Journal of Systematic y Evolutionary Microbiology* 54, 1037-1048
  33. Lee I.M., Martini M., Bottner K.D., Dane R.A., Black M.C. y Troxclair N. 2003. Ecological implications from a molecular analysis of phytoplasmas involved in an Aster Yellows epidemic in various crops in Texas. *Phytopathology* 93, 1368-1377.
  34. Lee I.M., Zhao Y. y Bottner K.D. 2006. SecY gene sequence analysis for finer differentiation of diverse strains in the aster yellows phytoplasma group. *Molecular and Cellular Probes* 20, 87-91.
  35. Leyva-López N.E., Ochoa-Sánchez J.C., Leal-Klevezas D.S. y Martínez-Soriano J.P. 2002. Multiple phytoplasmas associated with potato diseases in Mexico. *Canadian Journal of Microbiology* 48, 1062-1068.
  36. Longone V., González F., Zamorano A., Pino A.M., Araya J., Díaz V., Paltrinieri S., Calari A., Bertaccini A., Picciau L., Alma A. y Fiore N. 2011. Epidemiological aspects of phytoplasmas in Chilean grapevines. *Bulletin of Insectology* 64, S91-S92.
  37. Martini M., Lee I.M., Bottner K.D., Zhao Y., Botti S., Bertaccini A., Harrison N.A., Carraro L., Marcone C., Khan J. y Osler R. 2007. Ribosomal protein gene-based phylogeny for finer differentiation and classification of phytoplasmas. *International Journal of Systematic y Evolutionary Microbiology* 57, 2037-2051.
  38. Nejat N., Vadamalai G., Davis R.E., Harrison N.A., Sijam K., Dickinson M., Abdullah S.N. y Zhao Y. 2013. '*Candidatus Phytoplasma malaysianum*', a novel taxon associated with virescence y phyllody of Madagascar periwinkle (*Catharanthus roseus*). *International Journal Systematic Evolutionary Microbiology* 63, 540-548.
  39. Oxelman B., Lide'n M. y Bergund D. 1997. Chloroplast rps16 intron phylogeny of the tribe



- Sileneae (Caryophyllaceae). *Plant Systematic Evolution* 206, 393–410.
40. Perilla L.M. 2013. Determinación de la capacidad de transmisión de fitoplasmas en dos morfoespecies de la familia Cicadellidae (Hemiptera: Auchenorrhyncha) de Bogotá D.C. Tesis para optar al título de Magister en Bioquímica, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá.
  41. Perilla-Henao L.M., Dickinson M. y Franco-Lara L. 2012. First report of '*Candidatus Phytoplasma asteris*' affecting woody hosts (*Fraxinus uhdei*, *Populus nigra*, *Pittosporum undulatum* y *Croton* spp.) in Colombia. *Plant Disease* 96, 1,372.2 - 1,372.2.
  42. Perilla L.M., Gutiérrez C.G., Filgueira J.J. y Franco-Lara L. 2010. Inoculación experimental de tres especies hospederas de fitoplasmas en Bogotá, Colombia. *Revista Facultad de Ciencias* 6, 198-213.
  43. Prince J.P., Davis R.E., Wolf T.K., Lee I-L, Mogen B.D., Dally E.L., Bertaccini A. y Barba M. 1993. Molecular detection of diverse mycoplasma-like organisms (MLOs) associates with grapevine yellows y their classification with Aster Yellows, X-Disease, y Elm Yellows MLOs. *Phytopathology* 83, 1130-1137.
  44. Sears B.B. y Kirkpatrick B.C. 1994. Unveiling the evolutionary relationships of plant pathogenic mycoplasma-like organisms. *ASM News* 60, 307–312.
  45. Seemüller E., Marccone C., Lauer U., Ragozzino A. y Göschl M. 1998. Current status of molecular classification of the phytoplasmas. *Journal of Plant Pathology* 80: 3–26.
  46. Seemüller E., Schneider B. y Maürer R. 1994. Phylogenetic classification of phytopathogenic mollicutes by sequence analysis of 16S ribosomal DNA. *International Journal Systematic Bacteriology* 44, 440-446.
  47. Smart C.D., Schneider B., Blomquist C.L., Guerra L.J., Harrison N.A., Ahrens U., Lorenz K.H., Seemüller E. y Kirkpatrick B.C. 1996. Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of 16S rRNA spacer region. *Applied Environmental Microbiology* 62, 2988–3033.
  48. Sinclair W. A. y Griffiths H. M. 1994. Ash yellows its relationship to dieback y decline of ash. *Annual Review of Phytopathology* 32:49-60
  49. Sinclair W. A., Griffiths H.M. y Davis R.E. 1996. Ash Yellows y Lilac Witches´Broom: phytoplasma diseases of concern in forestry y horticulture. *Plant disease* 80, 468-475.
  50. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M. y Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, y Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology y Evolution* 28, 2731-2739.
  51. Wei W., Davis R.E., Lee I-M y Zhao Y. 2007. Computer-simulated RFLP analysis of 16S rRNA genes: identification of ten new phytoplasma

- groups. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57, 1855–1867.
52. Weintraub P.G. y Beanland L. 2006. Insect Vectors of Phytoplasmas. *Annual Review Entomology* 51, 91–111.
  53. Zhao Y., Wei W., Davis R.E. y Lee I-M. 2010. Recent advances in 16S rRNA gene-based phytoplasma differentiation, classification y taxonomy. In: *Phytoplasmas: Genomes, Plant Hosts y Vectors*. Eds. PG Wintraub y P. Jones. CAB International 2010.
  54. Zhao Y., Wei W., Lee I-M., Shao J., Suo X. y Davis R.E. 2009. Construction of an interactive online phytoplasma classification tool, iPhyClassifier, y its application in analysis of the peach X-disease phytoplasma group (16SrIII). *International Journal of Systematic y Evolutionary Microbiology* 59, 2582–2593.
  55. Zunnoon-Khan S., Arocha-Rosete Y., Scott J., Crosby W., Bertaccini A. y Michelutti R, 2010. First report of '*Candidatus Phytoplasma fraxini*' (group 16SrVII phytoplasma) associated with a peach disease in Canada. *New Disease Reports* 21, 20.
  2. Bertaccini A., Nicolaisen M., Duduk B., Weintraub P., Jarausch W., Hogenhout S., Dickinson M. y Verbeek M. 2009. COST action FA 0807: Integrated Management of Phytoplasma Epidemics in Different Crop Systems. <http://www.costphytoplasma.ipwgn.net/> Consulta Diciembre 2013.
  3. Hort-answers. University of Illinois Extension. <http://urbanext.illinois.edu/hortanswers/browseproblemsbytype.cfm?PathogenTypeID=8>. Consulta Diciembre 2013

#### REFERENCIAS WEB

1. Davis R.E., Shao J., Lee I.-M., Wei W. y Zhao Y. 2009. Phytoplasma Resource Center. <http://plantpathology.ba.ars.usda.gov/phytoplasma.html> Consulta Diciembre 2013.