

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE FITOPLASMAS EN *ROSACEAS*

Tesis

Que presenta YOLANDA ISABEL HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ
como requisito parcial para obtener el grado de:
MAESTRO EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

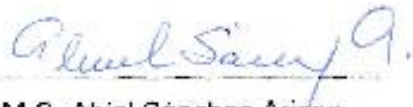
Saltillo, Coahuila

Julio de 2016

DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE FITOPLASMAS EN ROSACEAS

Tesis

Elaborada por YOLANDA ISABEL HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ como requisito parcial, para obtener el grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA con la supervisión y aprobación del Comité de Asesoría.



M.C. Abiel Sánchez Arizpe
Asesor principal




Dra. Ma. Elizabeth Galindo Cepeda
Asesor



Dra. Yisa María Ochoa Fuentes
Asesor



Dr. Alberto Flores Olivas
Asesor



Dr. Alberto Sandoval Rangel
Subdirector de Postgrado

AGRADECIMIENTOS

A MI ALMA TERRA MATER por abrir de nuevo sus puertas y acogerme en su seno para darme la oportunidad de seguir formándome como profesionalista, brindándome las herramientas necesarias para salir adelante y enfrentar todos los obstáculos que se presentaron en esta pequeña estadía. Al Programa de Posgrado en Parasitología Agrícola, por haber confiado en mí y no dudar de mis capacidades para lograr este nuevo reto, a los profesores y personas que laboran en este bello departamento que de todos me llevo muchos aprendizajes.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca de manutención ya que es de gran ayuda.

Al Laboratorio de biología molecular por darme la oportunidad de realizar mi investigación en las instalaciones y sobre todo a la M.C. lidia por contribuir con la asesoría de técnicas de protocolos así como la paciencia que me tuvo durante la misma, así como al contribuir con materiales y reactivos disponibles que hicieron que esta investigación se llevara a cabo. Mis más sinceros agradecimientos

Al MC. Abiel Sánchez Arizpe por la paciencia y la guía en posgrado y por la confianza que deposito en mi para lograr este proyecto.

Dra. Ma. Elizabeth Galindo Cepeda por todos sus consejos y escucharme cuando se me presentaban problemas y por su apoyo a la realización de este trabajo.

Dra. Yisa María Ochoa Fuentes por sus consejos y palabras de aliento.

Dr. Alberto Flores Olivas por abrir las puertas del laboratorio de biología molecular para culminar esta investigación.

DEDICATORIAS

A Dios:

Quien me dio la fe, la fortaleza, la salud y la esperanza para terminar este trabajo.

A mis padres:

A mi padre Sr. José Arturo Hernández Díaz. Que me enseñó a seguir los sueños y mostrarme que los sacrificios que se hacen por un sueño, vale la pena y que de esos pequeños sacrificios valoramos más las cosas que obtenemos.

A mi madre Sra. Flor María Hernández Vázquez. Que de ella tengo el ejemplo de nunca darme por vencida que con su AMOR me enseñó a valorar y dar valor cada una de las cosas que tengo y que de ella he aprendido que lo más importante es la familia y el amor a ella y por enseñarme a superarme.

A mis hermanos:

Laura, Carlos y Javier. De cada uno aprendo cosas nuevas y de ellos tomo la energía para superarme porque siempre seremos un equipo.

A mi pequeña familia:

A mi esposo Alejandro De La Cruz Armas. Quien me brinda su amor, su cariño, su estímulo y su apoyo constante. Su confianza, comprensión y paciente espera para que pudiera terminar el grado son evidencia de su gran amor. ¡Gracias! TE AMO.

A mis princesas Kamila Yolisbel y Ximena Alejandra. Posiblemente en este momento no entiendan mis palabras; pero para cuando sean capaces; quiero que se den cuenta de lo que significan para mí. Son la razón de que me levante cada día para esforzarme por el presente y por el mañana, son mi principal motivación.

Como en todos mis logros siempre están presentes. Las amo par de pingas.

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	ii
DEDICATORIAS.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	vi
RESUMEN.....	vii
ABSTRACT	x
INTRODUCCIÓN	1
Objetivos.....	2
Hipótesis	2
REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
Los Fitoplasmas	3
Origen.....	3
Clasificación y características	3
Clasificación de los Mollicutes (AGRIOS 4ª EDICIÓN).....	4
Justificación de la pertenencia de los fitoplasmas a la clase Mollicutes	5
Características específicas de los fitoplasmas.....	6
Clasificación de los Fitoplasmas.....	7
El gen 16S rDNA	7
Clasificación de los fitoplasmas.....	7
Caracterización molecular de los fitoplasmas	8
Huéspedes de fitoplasmas	9
Sintomatología.....	9
Medidas de control.....	11
Proliferación de Manzana o Apple Proliferation (AP)	11
Origen.....	12
Clasificación taxonomía	13
Distribución geográfica.....	13
Sintomatología de la enfermedad Proliferación de la manzana (AP)	14
Distribución del fitoplasma en el árbol	15
Vector de fitoplasma	16
Detección del Fitoplasma.....	17
Ensayo biológico	17
Ensayo serológico.....	18
Análisis Molecular	18

Extracción de ADN.....	18
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	18
Diagnóstico Molecular para PCR directa.....	19
Fragmentos de restricción análisis polimórficos (RFLP).....	19
Hibridación Dot –Blot	19
Detección e inspección	19
Similitudes con otras especies / Condiciones.....	20
Prevención y control	20
MATERIALES Y MÉTODOS	21
Localización del Experimento.....	21
Muestreo y Colecta de Material Vegetal.....	21
Determinación de incidencia	22
Determinación de severidad.....	22
Preparación de muestras para observación al microscopio.....	23
Análisis Molecular	25
Extracción de ADN.....	25
Detección de fitoplasmas mediante aplicación de ADN.....	26
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
CONCLUSIONES.....	31
LITERATURA CITADA.....	32

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1 Clasificación de los seres vivos en tres dominios según el modelo filogenético basado en las secuencias del gen ribosómico descrito por Woese et al., 1990.	4
Fig. 1.1 Enfermedad X del melocotonero (WX), fitoplasmas en tubos cribosos.....	6
Fig. 1.2 Síntomas característicos de fitoplasmas en planta: esterilidad de flores (a), virescencia y filodia(b),desarrollo de yemas adventicias” escoba de bruja”(c-d-h),ausencia de lignificación(e),obturación y necrosis del floema(f),desarreglos vegetativos(g), brotación prematura(i),amarilleo de las hojas(m) o de los nervios(j), y enrojecimiento (k) enrollamiento de las hojas(l).	11
Fig. 1.3 Mapa de ' Ca.Fitoplasmas mali'. Los valores de baja a alta indican un aumento del riesgo basada en la disponibilidad de transmisión. Mapa cortesía del USDA - APHIS - PPQ - CPH.....	14
Fig. 1.4 Síntomas característicos de candidatus fitoplasma mali, (a) escoba de bruja, (b) clorosis y pérdida de lamina foliar.....	16
Fig. 1.5 Vectores asociados al fitoplasma (a) psylidos (b) saltahojas <i>Fiebertiella florii</i>	17
Fig. 2 Ubicación de sitio de muestreo y procesamiento de material vegetal.	21
Fig. 1 Clasificación de los seres vivos en tres dominios según el modelo filogenético basado en las secuencias del gen ribosómico descrito por Woese et al., 1990.....	4
Fig. 1.2 Síntomas característicos de fitoplasmas en planta: esterilidad de flores (a), virescencia y filodia(b),desarrollo de yemas adventicias” escoba de bruja”(c-d-h),ausencia de lignificación(e),obturación y necrosis del floema(f),desarreglos vegetativos(g), brotación prematura(i),amarilleo de las hojas(m) o de los nervios(j), y enrojecimiento (k) enrollamiento de las hojas(l).....	11
Fig. 1.3 Mapa de ' Ca.Fitoplasmas mali'. Los valores de baja a alta indican un aumento del riesgo basada en la disponibilidad de transmisión. Mapa cortesía del USDA - APHIS - PPQ - CPH.....	14
Fig. 1.4 Síntomas característicos de candidatus fitoplasma mali, (a) escoba de bruja, (b) clorosis y pérdida de lamina foliar.	16
Fig. 1.5 Vectores asociados al fitoplasma (a) psylidos (b) saltahojas <i>Fiebertiella florii</i>	17

RESUMEN

DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE FITOPLASMAS EN *ROSACEAS*

POR:

YOLANDA ISABEL HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ

MAESTRO EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

M.C. ABIEL SÁNCHEZ ARIZPE–ASESOR–

SALTILLO, COAHUILA JULIO 2016

Los fitoplasmas son patógenos de plantas, generalmente habitan el floema y son transmitidos de planta a planta por insectos que se alimentan de floema. Los fitoplasmas, llamados formalmente organismos parecidos a micoplasmas, están asociados con enfermedades en varios cientos de especies de plantas. El uso de sondas moleculares, DNA clonado de fitoplasmas específicos y anticuerpos monoclonales han hecho posible clasificar a los fitoplasmas con base en la homología DNA–DNA y los datos serológicos. Recientes investigaciones, particularmente el análisis de secuencias de rDNA 16S han revelado que los fitoplasmas constituyen un taxón coherente a nivel de género. En el clado monofilético fitoplasma, se han delineado grupos y subgrupos, muchos de ellos están siendo considerados como especies putativas bajo el estatus provisional de 'Candidatus' para procariontes incompletamente descritos.

Las especies hospedantes y los síntomas pueden indicar la identidad del fitoplasma causal, pero la confiabilidad de un diagnóstico basado solamente en lo síntomas aparentes deben aprenderse empíricamente para cada síndrome.

Sin embargo, pocos síntomas pueden diferenciarse sólo con base en los esquemas de clasificación actuales. Se requiere mucha investigación para identificar los mecanismos de patogenicidad así como la respuesta de la planta para comprender como los fitoplasmas inducen el desarrollo de los síndromes de la enfermedad.

El conocimiento de la diversidad biológica de las cepas de fitoplasma en la naturaleza, será una manera de investigar la epidemiología de las enfermedades inducidas por fitoplasmas y quizá ayude a prevenir la dispersión de esas enfermedades que aparecen en diferentes regiones del

mundo debido al intercambio internacional de germoplasma. Esto es esencial cuando una enfermedad inducida por fitoplasmas que es nativa y común en una región puede ser exótica en otra (por ejemplo, el fitoplasma de la manzana es común en Europa pero exótica en América). También es necesaria la información acerca de la variabilidad genética dentro de una cepa de fitoplasma para el desarrollo de plantas resistentes.

El uso del enfoque molecular para detectar, identificar, y clasificar fitoplasmas ha permitido (1) determinar asociaciones consistentes de algunos fitoplasmas con enfermedades específicas (2) reconocer algunas enfermedades como complejos de varios desórdenes celulares similares, causados por diferentes fitoplasmas, (3) develar infecciones de plantas individuales por especies mixtas de fitoplasmas.

Palabras clave: Candidatus, síndrome, fitoplasma, floema.

ABSTRACT

DETECTION AND IDENTIFICATION OF PHYTOPLASMAS IN Rosaceae

BY:

YOLANDA ISABEL HERNANDEZ HERNANDEZ

MASTER OF SCIENCE IN AGRICULTURAL PARASITOLOGY

AGRARIA ANTONIO NARRO AUTONOMOUS UNIVERSITY

M.C. ABIEL SÁNCHEZ ARIZPE - ADVISER -

SALTILLO, COAHUILA JULY 2016

Phytoplasmas are plant pathogens, usually inhabit phloem and are transmitted from plant to plant by insects that feed on phloem. Phytoplasmas, formally called mycoplasma-like organisms are associated with diseases in several hundred plant species. The use of molecular probes, specific cloned DNA phytoplasmas and monoclonal antibodies have made it possible to classify phytoplasmas based on DNA-DNA homology and serologic data. Recent research, particularly the analysis of 16S rDNA sequences revealed that the phytoplasma taxon constitute a coherent gender level. In the monophyletic clade phytoplasma, they have been delineated groups and subgroups, many of them are being considered as putative species under the provisional status of 'Candidatus' for prokaryotes incompletely described.

The host species and symptoms may indicate the identity of the causal phytoplasma, but the reliability of a system based only on the apparent symptoms diagnosis must be learned empirically for each syndrome.

However, only few symptoms can differ based on the current classification schemes. Much research is needed to identify the mechanisms of pathogenicity and the response of the plant to understand how phytoplasmas induce the development of disease syndromes.

Knowledge of the biological diversity of strains of phytoplasma in nature, be a way to investigate the epidemiology of diseases induced by phytoplasma and may help to prevent the spread of these diseases that appear in different parts of the world due to international exchange germplasm. This is essential when a phytoplasma induced disease is native and common in a region can be exotic in another (eg apple phytoplasma is common in Europe but exotic in America). information about genetic variability within a phytoplasma strain for the development of resistant plants is also required.

Use of molecular approach to detect, identify, and classify phytoplasma allowed (1) determine consistent associations of some phytoplasmas with

specific diseases (2) recognize some diseases such complexes several similar cell disorders caused by different phytoplasmas (3) reveal infections individual plants for mixed species of phytoplasma.

Keywords: Candidatus, syndrome, phytoplasma, phloem.

INTRODUCCIÓN

Históricamente en la patología de plantas, como en la medicina animal, no sólo los patógenos sino también las enfermedades que causan se han nombrado teniendo como base a los síntomas mostrados por los hospederos infectados. Las enfermedades de las plantas atribuidas a los fitoplasmas no son la excepción a esta práctica. Por ejemplo, muchas enfermedades producidas por fitoplasmas, han sido clasificadas en términos generales, ya sea como enfermedades de declinación o de virescencia. Nombres de enfermedades como la declinación de la pera, amarillamiento letal de la palma, y otros, indica la importancia de la percepción de los síntomas en la asignación de los nombres comunes de las enfermedades. A su vez los nombres comunes de los patógenos se derivan de los nombres de las enfermedades de las plantas a las que son asociados. Haciendo una generalización se asume que cada enfermedad es causada por una sola especie de fitoplasma. Sin embargo, la investigación ha dejado en claro que diferentes fitoplasmas pueden causar síntomas aparentemente idénticos en ciertas plantas. Por otro lado, algunos fitoplasmas estrechamente relacionados pueden causar síntomas claramente diferentes en las plantas hospedantes. Además una enfermedad puede ser producida por diferentes fitoplasmas en diferentes regiones geográficas.

Cuando se encuentra una planta enferma, se tiende a ver el síndrome como la indicación de una enfermedad particular. Algunos síndromes inducidos por fitoplasmas específicos pueden estar suficientemente caracterizados para confiar en que los síntomas, o bien en la microscopia, son suficientes para el diagnóstico práctico. El diagnóstico de la enfermedad con base en los síntomas o la microscopia en circunstancias inapropiadas puede llevar a un diagnóstico erróneo y, subsecuentemente, a realizar esfuerzos equivocados en el manejo de la enfermedad. El diagnóstico preciso requiere la identificación del patógeno para el control efectivo de la enfermedad. Los fitoplasmas causan síndromes similares y se transmiten ampliamente por

diferentes vectores, así que el control efectivo de la enfermedad puede requerir la intervención en el ciclo de vida del vector. La identificación precisa del patógeno, es necesaria en casos de diferentes síndromes causados por fitoplasmas relacionados. Por ejemplo, diferentes cepas clasificadas en el grupo I de fitoplasmas (16S rRNA grupo I) pueden causar síntomas idénticos o diferentes en la misma especie de hospedante, dependiendo de la cepa elegida para comparación. La comprensión de las relaciones entre las propiedades biológicas y la clasificación basada en las secuencias conservadas requiere de estudios amplios del genoma de los fitoplasmas.

Partiendo de esta idea se ha basado la siguiente investigación ya que en la Sierra de Arteaga, Coahuila se han observado síntomas característicos de Fitoplasmas desde los años 90's. No se han identificado y caracterizado los agentes causales. De ahí la inquietud para hacer los estudios pertinentes para la identificación de estos agentes causales.

Partiendo de esto se plantean los siguientes:

Objetivos

- Determinar la incidencia y severidad de síntomas asociados a Fitoplasmas.
- Análisis molecular del síntoma escoba de bruja asociado la proliferación de la manzana en *Rosaceas*: manzano (*Malus domestica*) y capulín (*Prunus virginiana*).

Hipótesis: se espera identificar a *Candidatus* Fitoplasma mali como agente causal de escoba de bruja en manzano (*Malus domestica*) y capulín (*Prunus virginiana*) en la hurta de estudio y será posible determinar el nivel de daños.

REVISIÓN DE LITERATURA

Los Fitoplasmas

Origen

Se conocen desde hace unas 3 décadas. En 1967 gracias a la microscopía electrónica se determinó que algunas enfermedades llamadas “yellow diseases” eran producidas por células procariotas y no por virus como se presumía anteriormente (Doi *et al.*, 1967).

El descubrimiento de estos organismos parecidos a los micoplasmas causantes de enfermedades en animales, dio origen a un exhaustivo estudio y búsqueda de su parentesco con otros microorganismos. En un inicio se les llamo mycoplasma-like organisms o MLO. En 1964, el comité de taxonomía de micocutes de la IOM (international organization for micoplasmology) estableció el nombre actual fitoplasma. Recientemente ha sido propuesto el termino fitoplasma como candidato a género “*candidatus phytoplasma*” (The IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma working team, 2003) phytoplasma taxonomi group (2003).

Clasificación y características

En un inicio, los seres vivos se clasificaban en 5 reinos (Whittaker, 1969). sin embargo, Woese y sus colaboradores, mediante la comparación de genes ribosómicos presentaron un modelo filogenético que revolucionó los esquemas taxonómicos establecidos hasta el momento. los seres vivos pasaron a clasificarse en tres dominios como se ilustra en la figura 1:

Bacteria (o Eubacteria), Archae y Eucarya (Woese *et al.*, 1990).

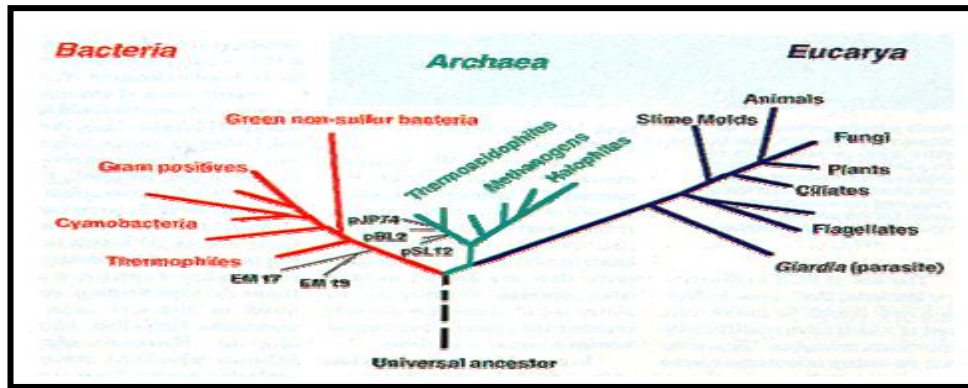


Fig. 1 Clasificación de los seres vivos en tres dominios según el modelo filogenético basado en las secuencias del gen ribosómico descrito por Woese et al., 1990.

En base al estudio de estos genes ribosómicos, los fitoplasmas se clasifican como:

Reino: Eubacteria

Phyllum: Tenericutes

Clase: Mollicutes

Clasificación de los Mollicutes (AGRIOS 4ª EDICIÓN)



El término Mollicute agrupa una serie de características como:

- Ausencia de pared celular, y por tanto resistentes a la penicilina y sensibles a la tetraciclina y sus derivados (Tully 1989).

- Pleomorfismo
- Capacidad de pasar a través de poros de 450nm.
- Genoma de pequeño tamaño.
- Parásitos comensales y saprofitos de animales y plantas

Basándose en estudios filogenéticos de la secuencia del gen ribosómico 16S rDNA (Weisburg *et al.*, 1989; Woese *et al.*, 1980) se determinó que los Mollicutes estaban relacionados con las bacterias Gram +, con un contenido guanina/citosina (G+C) bajo. Ambos se habrían originado de un mismo microorganismo ancestral, pero los Mollicutes en su evolución, habrían ido reduciendo sucesivamente su genoma así como, perdido la pared celular.

Justificación de la pertenencia de los fitoplasmas a la clase Mollicutes

A partir de 1989 empiezan hacerse estudios que aclaran la pertenencia de los fitoplasmas a la clase de los Mollicutes. Los genomas de MLO (fitoplasmas) contienen entre un 25 y un 32% de G+C (Kollar *et al.*, 1989; Sears *et al.*, 1989) y tiene entre 640 y 1185 Kb (Neimark & Kirkpatrick, 1993; Laurer y Seemüller, 2000; Padovan *et al.*, 2000), valores similares a los micoplasmas que se están cultivando.

Comparando las secuencias ribosómicas del 16S rDNA de dos MLOs pertenecientes al actual grupo de los AY (Lim & Sears, 1989; Kuske & Kirkpatrick, 1992) con otros procariontes, se demuestran que los MLO están emparentados filogenéticamente con los Mollicutes, y dentro de esta clase, sus secuencias ribosómicas tendrían más homología con *Acholeplasma laidlawii*, del Orden Acholeplasmatales que con otros como *Mycoplasma capricolum*, del Orden Mycoplasmatales (Lim & Sears, 1992).a

Otros estudios que corroboran su parentesco con el Orden Acholeplasmatales son:

*Los MLO, al igual que *A. laidlawii*, utilizan UGA como codón de terminación y por tanto se diferencian de *M. capricolum* del Orden Micoplasmatales (Lim & Sears, 1992).

* Las características de la membrana del MLO, AOY, cuando se cultiva en ausencia de esterol son más cercanas a *A. aidlawii* que la de *M. gallisepticum* (Lim & Sears, 1992).

Características específicas de los fitoplasmas

Son parásitos estrictos del hábitat intracelular de plantas e insectos vectores. Su tamaño y desarrollo depende del grado de desarrollo de los tubos cribosos donde se localizan, con capacidad de pasar lentamente a través de los poros de las células cribosas del floema.

La célula de los fitoplasmas está rodeada por una membrana plasmática trilaminar de unos 10nm de grosor, compuesta, que al igual que el resto de los procariontes, de 2/3 de proteínas y un 1/3 de lípidos. Su citoplasma contiene ribosomas para la síntesis proteica, y una molécula de ADN doble circular. Se ha detectado también la presencia de ADN extracomosomal (Davis *et al.*, 1988; Nakashima & Hayashi, 1995; Nishigawa *et al.*, 2001).

El genoma es pequeño, con un alto contenido en genes. Presenta un único gen de tRNA isoleucina, común de todos los fitoplasmas (Kirkpatrick *et al.*, 1994). Por estudios serológicos y moleculares también se ha visto que los fitoplasmas contienen un gen que codifica para una proteína de la membrana y esta es única para cada tipo. Estas proteínas son abundantes en la superficie externa de la célula (Milne *et al.*, 1995) y de su estudio, se podría explicar la posible interacción fitoplasma – huésped como se ilustra en la figura 1.1 (Morton *et al.*, 2003).

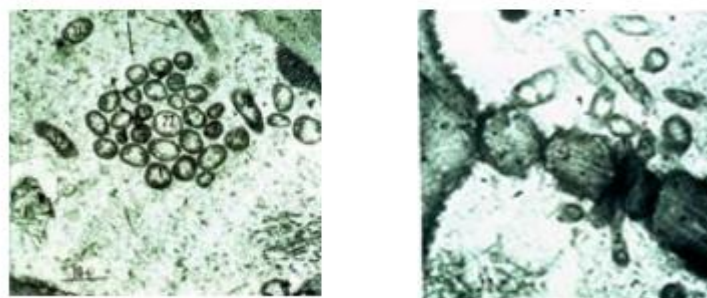


Fig. 1.1 Enfermedad X del melocotonero (WX), fitoplasmas en tubos cribosos.

Los fitoplasmas se transmiten a través de insectos vectores pertenecientes al orden Hemiptera (Familias *Cicadellidae*, *Coxidae*, *Cercopidae*, *Psyllidae* y *Fulgoridae*) con multiplicación persistente en el insecto. Aunque normalmente no se transmiten a la descendencia, se ha podido demostrar la transmisión vertical del fitoplasma FD y SWLP en los vectores *Scaphoideus titanus* Ball (Alma *et al.*, 1997) y *Matsumuratettix hiroglyphicus*, Matsumura (Hanboonsong *et al.*, 2002) respectivamente.

Clasificación de los Fitoplasmas

El gen 16S rDNA

Constituido por 1500 bases, se encuentra en el operon ribosómico de los procariontes, junto con 2 genes de ADN ribosómicos, el 23S de 2900 bases y el 5S de 120 bases. Su orden es 16S, 23S y 5S. Entre estos genes se encuentran las regiones espaciadoras, que pueden contener uno o más genes de ADNt o de transferencia. Los operones ribosómicos en los procariontes se transcriben en una sola molécula de ARN y más adelante se separan por cortes enzimáticos (Condon *et al.*, 1992).

Como se ha hecho referencia anteriormente, los ARN ribosómicos han adquirido importancia en el estudio de la evolución de las bacterias. En concreto los genes ribosómicos 16S y 23S son utilizados como cronómetros moleculares en el estudio de la filogenia microbiana y sistemática (Gutell *et al.*, 1994). Así el estudio del gen 16S rDNA (con regiones conservadas) por RFLP, se ha utilizado para separar los fitoplasmas en grupos y subgrupos (Razin, 1992; Lee *et al.*, 1993; Schneider *et al.*, 1993).

Clasificación de los fitoplasmas

Actualmente, mediante la amplificación de segmentos del gen 16S rDNA por PCR y RFLP, se han clasificado fitoplasmas en 20 grupos (Seemüller *et al.*, 1998), o en 14 grupos (Lee *et al.*, 1998). Sin embargo este gen no

parece tener suficiente variabilidad como para permitir diferenciar aislados que, siendo clasificados como el mismo fitoplasma difieran en la planta o insecto de los que son huésped.

Caracterización molecular de los fitoplasmas

Hasta el momento, se han realizado estudios filogenéticos basándose en el gen 16S rRNA y utilizando la técnica del PCR y RFLPs. Asimismo, la amplificación de genes de algunas proteínas ribosomícos y de factores de transcripción y elongación, han confirmado las relaciones filogenéticas establecidas para los fitoplasmas entre ellos y con otros microorganismos, como los acheloplasmas (Scheneider *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1998; Berg & Seemüller, 1999; KuoChieh, 2001).

Por otro lado, la utilización de la tecnología del ADN recombinante ha permitido aislar distintos fragmentos cromosómicos (Kirkpatrick *et al.*, 1987; Kollar *et al.*, 1990) y extra cromosómicos (Nakashima & Hayashi, 1995; Kuboyama *et al.*, 1998) de ADN pertenecientes a fitoplasmas que se han utilizado por un lado, para detectar los fitoplasmas mediante hibridación de los ácidos nucleicos en plantas e insectos y, por otro para establecer nuevas relaciones filogenéticas (Kirkpatrick *et al.*, 1987; Boudon- Padieu *et al.*, 1989; Sears *et al.*, 1989; Bertaccini *et al.*, 1990; Kollar *et al.*, 1990; Lee *et al.*, 1990; Kuske *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 1992; Kuan & Su *et al.*, 1998; Blomquist & Kirkpatrick, 2002; MengLing *et al.*, 2002).

Se abordó el estudio de genes diferentes al 16S rRNA para la comprensión de la biología de los fitoplasmas (Oshma *et al.*, 2002; Liefting & Kirkpatrick, 2003), y con el estudio de genómica se espera dar respuesta a cuales son las condiciones necesarias para su cultivo, así como los factores que interviene en la especificidad del vector / planta. Hasta el momento, se han aislado genes que codifican para proteínas de membrana de diferentes fitoplasmas, a partir de los cuales se han desarrollado sueros monoclonales y policlonales (Yu *et al.*, 1998; Berg *et al.*, 1999; Blomquist *et al.*, 2001; Mergenthaler *et al.*, 2001; Morton *et al.*, 2003). Estas proteínas de membranas, al igual que en otros Molluscos podrían estar implicadas en el

reconocimiento específico del huésped y patogénesis (Wise *et al.*, 1992; Ye *et al.*, 1997; Berg *et al.*, 2000).

Huéspedes de fitoplasmas

Los fitoplasmas, como parásitos estrictos, solo viven en plantas y en sus insectos vectores. Estos se pueden transmitir por uno o varios vectores, dependiendo del grado de especificidad. Existen fitoplasmas con baja especificidad por el vector como la enfermedad X del melocotonero, CP o el AY a los que se les conoce varias especies de insectos transmisores de la enfermedad (Toth *et al.*, 1994; Maürer *et al.*, 1993). En cambio otros fitoplasmas solo se transmiten por un vector como es el caso de FD en viña, transmitido a esta únicamente por cicadelido *Scaphoideus titanus* Ball (Alma *et al.*, 1997).

El rango de plantas huésped por cada fitoplasma depende del comportamiento alimenticio del insecto. Vectores monofagos u oligofagos, diseminan el fitoplasma entre una o pocas especies vegetales, el caso de *Cacopsylla pry* y el fitoplasma de PD.

En cambio si el insecto se alimenta de diferentes especies vegetales, el fitoplasma afectara a un mayor rango de plantas, como el caso de *Macrosteles fascifron* que trasmite el fitoplasma AAY (16Srl -A, - B) a más de 191 especies plantas diferentes (Golino *et al.*, 1989; McCoy *et al.*, 1989).

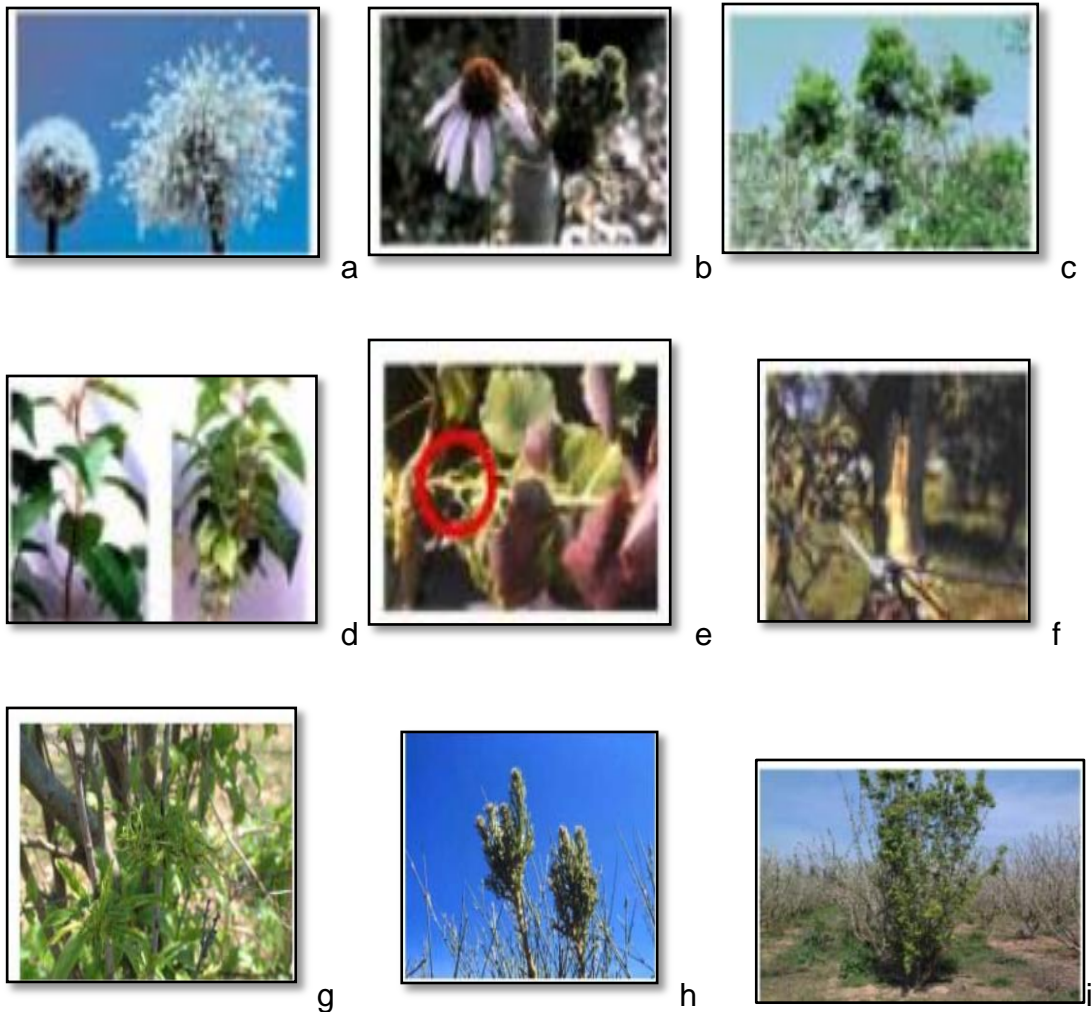
Sintomatología

En general, las enfermedades de las plantas asociadas a estos patógenos se reconocen por un conjunto de síntomas, que sugieren profundas alteraciones en el equilibrio hormonal de la planta, en la fotosíntesis y en las sustancias de reserva (Pertot *et al.*, 1998; Lepka *et al.*, 1999; Musetti *et al.*, 1999; Musetti *et al.*, 2000).

Los síntomas que presentan con mayor frecuencia son:

- ✓ Amarillamiento o clorosis
- ✓ Enrojecimiento precoz de las hojas
- ✓ Esterilidad de flores
- ✓ Virescencia (petalos adoptan un color verde)
- ✓ Filodia (transformación de órganos florales en estructuras foliares)
- ✓ Proliferación de yemas adventicias dando lugar a “escobas de bruja”
- ✓ Enanismo generalizado
- ✓ Desarreglos vegetativos
- ✓ Enrollamientos de hojas
- ✓ Decaimiento general

Algunos de estos síntomas son casi exclusivos de espiroplasmas y fitoplasmas (virescencia, filodia, escoba de bruja) como se observan en la figura 1.2.



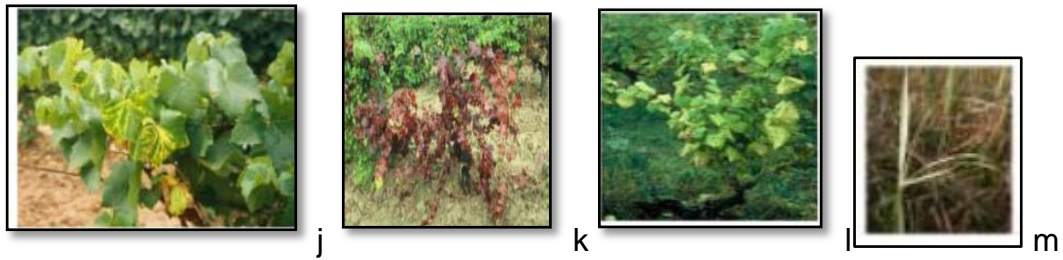


Fig. 1.2 Síntomas característicos de fitoplasmas en planta: esterilidad de flores (a), virescencia y filodia(b), desarrollo de yemas adventicias” escoba de bruja”(c-d-h), ausencia de lignificación(e), obturación y necrosis del floema(f), desarreglos vegetativos(g), brotación prematura(i), amarilleo de las hojas(m) o de los nervios(j), y enrojecimiento (k) enrollamiento de las hojas(l).

Medidas de control

Los fitoplasmas son microorganismos con baja tolerancia a temperaturas altas (37°C), de manera que periodos de incubación a 37-40°C inhiben la multiplicación del patógeno, lo que se supone que los ápices de los brotes desarrollados durante el tratamiento estén sanos (Németh, 1986). Para la eliminación del fitoplasma FD en viña, también se aplicó termoterapia mediante inmersión de esquejes o varillas en agua caliente (50 °C, 45s) (Boudon-Padieu & Grenan, 2002).

La quimioterapia también puede aplicarse, no obstante en elevadas dosis puede tener efectos tóxicos. Se han realizado diferentes bioensayos con antibióticos aunque no han tenido aplicación en campo debido a que su uso no es recomendado, según lo publicado por el ministerio de la agricultura, pesca y alimentación.

Proliferación de Manzana o Apple Proliferation (AP)

La proliferación de la manzana es una enfermedad asociada consistentemente con la presencia de fitoplasmas en los tubos cribosos de manzanos enfermas (Seemüller, 1976).

El fitoplasma causante de esta de la proliferación de la manzana (AP) se clasifica dentro del grupo 16S X subgrupo A (Lee *et al.*, 1998) o AP (Seemüller *et al.*, 1998) que engloba muchos subgrupos diferenciados por el patrón de bandas obtenido al digerir el ADN del gen 16S rDNA con una enzima de restricción concreta. Este fitoplasma de unas 670 pb (Laurer & Seemüller, 2000).

Origen

Los fitoplasmas del grupo de proliferación de la manzana se han reportado sólo en Europa, con la excepción del agente del rizado de melocotón amarillo, que se produce también en EE.UU. Los enrollamientos de la hoja del melocotón amarillo y decaimiento del peral, fitoplasmas que están estrechamente relacionados (Kirkpatrick *et al.*, 1994; Cisón *et al.*, 1994). De Apple proliferation es uno de los tres fitoplasmas pertenecientes al grupo de la proliferación de manzana.

AP se considera una de las enfermedades más importantes de fitoplasmas de la manzana (EPPO / CABI, 1997), sobre todo en las zonas del norte del sur de Europa, donde las temperaturas son las más propicias para la manifestación de los síntomas. Fuera de esta región, donde se producen las condiciones de cultivo frío o más caliente, la enfermedad parece ser de menor importancia (Seemüller *et al.*, 1998).

AP se informó a afectar a casi todas las variedades de manzana, causando reducciones en el tamaño la fruta hasta en un 50%, el peso del fruto por 63-74%, la calidad del fruto, a través de la reducción del contenido de azúcar y ácido, y el vigor del árbol. También aumenta la susceptibilidad de los árboles infectados con otros patógenos de las plantas, tales como mildiú polvoriento (*Podosphaera leucotricha*; Maszkiewicz *et al.*, 1980), o el hongo hoja de plata (*chondrostereum purpureum*; Németh, 1986). La mayoría de las pérdidas significativas (hasta 80%) se incurre durante la fase aguda de la enfermedad (es decir, la fase de shock.). Aunque un porcentaje considerable de la fruta sigue siendo insuficiente incluso después de este período. En algunos casos, AP también puede conducir a la muerte prematura de los árboles infectados (Németh, 1986; Seemüller, 1990; Smith *et al.*, 1988).

Clasificación taxonomía

Dominio: Bacteria

Filo: Firmicutes

Clase: Mollicutes

Orden: Acholeplasmatales

Familia: Acholeplasmataceae

Género: Fitoplasmas

Especie: Fitoplasmas mali

Németh, 1986

Distribución geográfica

Según los primeros registros por Németh , (1986) basado en los síntomas observados reporto la presencia en Austria, Bélgica , Bulgaria, Grecia , Noruega, Rumania , Suiza , antigua URSS , la antigua, a demás Seemüller , (1990) reporta la India y Sudáfrica .

Actualmente se encuentra distribuida en **África:** Túnez **Asia:** Siria, Turquía **Europa:** Albania, Alemania, Austria, Bélgica, BosniaHercegovina, Bulgaria, Croacia, República Checa, Finlandia, Francia, Alemania, Grecia, Hungría, Italia, Moldavia, Noruega, Polonia, Rumania, Serbia, Eslovaquia, Eslovenia, España, Suiza, y Ucrania (Avinent y Llacer, 1995; EPPO, 1997; CABI, 2009; Krizanac *et al.*, 2010; Ben Khalifa y Fakhfakh, 2011). Existen registros fiables de este fitoplasma en Chipre, India, Rusia y Sudáfrica (EPPO, 2014).

Para el año 2015 el USDA mando un reporte de alerta para la parte de estados Unidos con reportes de que este fitoplasma ya estaba causando daño y en la figura 1.3 se puede identificar claramente los brotes de la enfermedad como la velocidad de su transmisión.

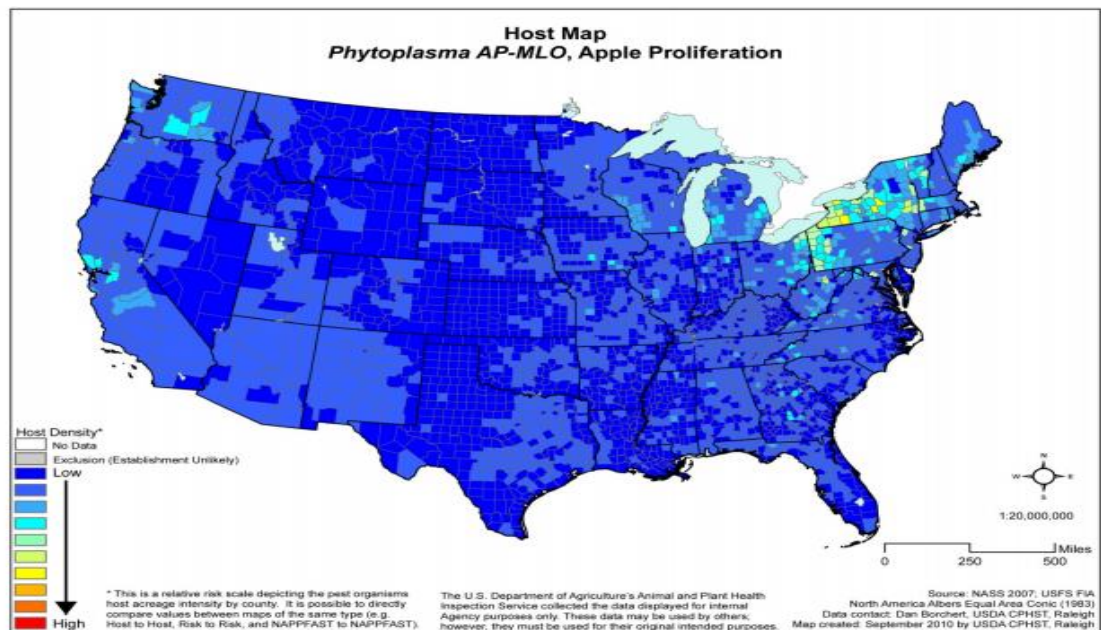


Fig. 1.3 Mapa de 'Ca.Fitoplasmas mali'. Los valores de baja a alta indican un aumento del riesgo basada en la disponibilidad de transmisión. Mapa cortesía del USDA - APHIS - PPQ - CPH.

Sintomatología de la enfermedad Proliferación de la manzana (AP)

Las hojas de las plantas infectadas se enrollan y se vuelven frágiles, son irregulares y finamente dentadas, son más pequeñas de lo normal; También se vuelven rojos en otoño en contraste con la coloración amarilla de plantas sanas. Las hojas de verano son a menudo cloróticas. se puede producir la defoliación temprana. Una roseta de hojas terminales a veces se desarrolla al final de la temporada en lugar de yemas latentes normales. Estípulas se agrandan de manera anormal, mientras que los pecíolos son más bien cortos.

Los brotes se desarrollan prematuramente a partir de yemas axilares y dan lugar a brotes secundarios que forman la escoba de bruja. El ángulo entre los brotes secundarios y el brote principal es anormalmente estrecho. Hoja de roseta puede aparecer en los extremos de brotes o las puntas de los brotes pueden morir de nuevo.

En algunos casos, las flores muestran numerosos pétalos y los pedúnculos son anormalmente largos. No son capaces de establecer y pueden permanecer en el árbol durante un largo período. Las frutas se reducen en

tamaño, coloración incompleta y pobre sabor. Los síntomas se distribuyen de forma desigual en toda la planta, a menudo ramas aparentemente saludables se encuentran con frutas normales. Los árboles afectados son menos vigorosos, pero rara vez mueren. A veces, después de una fase de shock, los árboles pueden producir con normalidad, sobre todo si son fertilizados adecuadamente. Peso de las raíces se reduce en un 20-40%. La circunferencia de tronco y diámetro de copa se reducen en comparación con los árboles sanos (Kunze, 1979).

Distribución del fitoplasma en el árbol

Los fitoplasmas patógenos de plantas leñosas y hojas caducas, suelen seguir un ciclo a lo largo de todo el año. A mediados de la primavera y coincidiendo con la nueva formación de tubos cribosos empiezan a distribuirse por todo el árbol. Durante el otoño alcanzan las máximas concentraciones y con la llegada del invierno disminuyen en la parte aérea, distribuyéndose en las raíces (Tahama, 1975; Schaper, 1981). Existen algunos trabajos que indican que los fitoplasmas podrían encontrarse también en la parte aérea durante la dormancia invernal (Jurash *et al.*, 1999).

La distribución de AP fitoplasmas en el árbol no es constante a lo largo del año (Schaper y Seemuller, 1982). Seemuller *et al.* (1984) demostraron que durante los meses de invierno (diciembre a marzo), la población fitoplasmas AP disminuye notablemente en los tallos de las plantas en respuesta a la degeneración de los elementos de tubo de tamiz. Por el contrario, el organismo podría encontrarse en las raíces de todos los árboles de la enfermedad en un número relativamente altas durante todo el año.

Baric *et al.* (2011) también encontró, sin embargo, que no había estacionalidad en la concentración de fitoplasmas en las raíces con las más altas poblaciones detectadas a partir de diciembre a mayo. La "nueva invasión" del tallo de las raíces se produjo en abril o mayo y aumentó en verano a su nivel más alto a finales de verano o principios del otoño. Pedrazzoli *et al.* (2008a) encontró que el fitoplasma estuvo ausente de las partes aéreas de las plantas a finales de primavera, reapareció

progresivamente durante el verano, y el pico máximo se produjo entre mediados de julio y finales de diciembre. Seemuller *et al.* (1984) no atribuir esta reacción a la sensibilidad a baja temperatura, debido a que la tasa de supervivencia del organismo en árboles enfermos expuesto a temperaturas entre + 4 ° C (39 ° F) y -20 ° C (-4 ° F) fue similar como se ilustra en la figura 1.4.



Fig. 1.4 Síntomas característicos de *candidatus* fitoplasma mali, (a) escoba de bruja, (b) clorosis y pérdida de lamina foliar.

Vector de fitoplasma

Los vectores conocidos (o insectos asociados)

Vectores primarios: *Cacopsylla picta* (*C. costal*), *C. melanoneura*, y *Fieberiella florii*. (Tedeschi *et al.*, 2002; Frisinghelli *et al.*, 2000) reportaron que el Psílido *Cacopsylla melanoneura* y *C. picta* (*C. costal*) son vectores de la proliferación de la manzana en Italia. (Jarausch *et al.*, 2003; Carraro *et al.*, 2008).

En Alemania, el saltahojas *Fieberiella florii* ha sido reportado como un vector de la proliferación de manzana fitoplasmas (Bliefernicht y Krczal, 1995; Krczal *et al.*, 1988; Tedeschi y Alma, 2006).

F. florii se reporta tanto en Europa y América del Norte como probable vector del fitoplasma AP. Hegab y El-Zohairy (1986) reportaron a *Philaenus spumarius* e *interstitialisrtianus*, un saltamontes, que transmite la proliferación de la manzana, pero estos resultados no pudieron ser confirmados por otros autores figura 1.5 (Krczal *et al.*, 1988;. Refatti *et al*, 1986).

Los árboles infectados con la proliferación de la manzana son particularmente sensibles al oídio (*Podosphaera leucotricha*) (EPPO, 1997).



Fig. 1.5 Vectores asociados al fitoplasma (a) psylidos (b) saltahojas *Fieberiella florii*.

Detección del Fitoplasma

Ensayo biológico

La identificación positiva requiere la transmisión de una especie indicadora. *Malus dawsoniana*, es un indicador muy sensible, cuando se injertan en junio sobre el vástago, desarrolla síntomas en el otoño siguiente. Utilizando la técnica de doble ciernes, la reacción aparece después de la brotación. (Anon., 1997). El uso del reactivo de DAPI (1,6 diamino 2-fenilindol) puede ayudar a detectar la fluorescencia de fitoplasmas en los tubos cribosos del floema bajo la corteza de los árboles de manzana infectados.

Ensayo serológico

La proliferación de Apple se puede detectar en los manzanos infectados usando anticuerpos monoclonales (MAbs) a fitoplasmas AP obtenidas a partir de AP fitoplasmas infectados *Catharanthus roseus* como fuente de antígeno. Estos MAbs reaccionan específicamente en ELISA e inmunofluorescencia (IF) (Loi *et al.*, 1998). Su patente es pendiente. Adgen Ltd. también han producido un antisuero específico de AP fitoplasmas, que trabaja con extractos de manzana si hay suficiente antígeno presente. Por lo general, la concentración de fitoplasmas es un factor limitante.

Análisis Molecular

Extracción de ADN

Cortes de nervadura central y el tejido de la vena principal (1 g) deben ser utilizados a partir de hojas recogidas en agosto y septiembre, evitando grandes áreas necróticas. Utilice el siguiente procedimiento fitoplasmas enriquecido (Ahrens y Seemüller (1992) para obtener ADN para la PCR.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Se basa en la utilización de secuencias de ADN como cebadores, para poder realizar una amplificación del fragmento situado entre estas secuencias. para el diseño de cebadores en fitoplasmas, se utilizan las regiones mas conservadas del gen 16S rDNA.

Varios cebadores destinados a procedimientos de diagnóstico para el diagnóstico de enfermedades de fitoplasmas han sido identificados, entre ellos son los específicos para el grupo de la proliferación de la manzana (Firrao *et al.*, 1994;.. Jarausch *et al.*, 1994; Lorenz *et al.*, 1995;.Inteligente *et al.*, 1996).

Diagnóstico Molecular para PCR directa

Fragmentos de restricción análisis polimórficos (RFLP)

El uso de la amplificación por PCR del rDNA 16S de diferenciar fitoplasmas pertenecientes al mismo grupo es difícil debido a la gran similitud de sus secuencias de modo que es necesario para digerir los productos de amplificación por endonucleasas de restricción.

Hibridación Dot –Blot

El diagnóstico diferencial de la proliferación de manzana y fitoplasmas amarillos de frutas de hueso europeos se puede hacer mediante la hibridación de oligonucleótidos en presencia de cloruro de tetrametilamonio (Malisano *et al.*, 1996). Este enfoque de diagnóstico puede ser más práctico que además PCR RFLP para diferenciar los dos fitoplasmas que causan la proliferación de manzana y ciruela leptonecrosis en Europa, que son enfermedades importantes económicamente en las principales áreas de crecimiento de árboles frutales. También es adecuado para la evaluación automática de un gran número de muestras.

Detección e inspección

La parte superior de la proliferación Apple se detecta de forma rutinaria mediante la observación visual y mediante pruebas de campo en *Malus domestica* Golden Delicious con cinco repeticiones por 2 años (EPPo / EPPO , 1991/1992) . Para el diagnóstico de laboratorio por lo menos cinco muestras por planta deben ser recogidas al azar con el fin de evitar resultados falsos negativos debido al bajo título y la distribución irregular de estos patógenos en el floema de la planta. Las muestras de hojas, pecíolos, tallos deben ser recogidos al final de agosto. El uso de material fresco se recomienda en ensayos de diagnóstico. Sin embargo, si esto no es posible, el material de ensayo debe ser almacenado a -20 ° C.

Similitudes con otras especies / Condiciones

Los criterios utilizados para diferenciar la proliferación de la manzana de los otros fitoplasmas y los Mollicutes relacionados son: de longitud completa del 16S ADNr ; 16S / 23S región espaciadora ; RFLP de PCR-amplificación de ADN ribosomal productos ; y patrones de RFLP de ADN no ribosómico (análisis Southern) .

Prevención y control

Como medida preventiva, el uso de material de propagación sano es un requisito previo. El control intensivo de las malas hierbas y las plagas de insectos en los huertos es también esencial. La eliminación de brotes de raíz es una medida de control para reducir la difusión de los saltamontes que viven sobre las malas hierbas. Fitoplasmas son sensibles a la tetraciclina, pero este antibiótico es bacteriostático en vez de bactericida. Después del tratamiento con antibióticos, los síntomas pueden disminuir notablemente durante 2 años (Casanova *et al.*, 1980), pero a menudo esto sólo se observa como un efecto temporal (Schmidt, 1983). El uso de tetraciclina sin querer puede seleccionar poblaciones bacterianas resistentes. En estudios se observó que rizoma resistente es la forma más eficaz para controlar la enfermedad (Seemüller, 1990).

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del Experimento

El experimento se realizó en dos partes la primera parte se colectaron muestras en Rancho Nuevo localidad de los Lirios ubicado en la Sierra de Arteaga.

Las muestras se analizaron en el laboratorio de parasitología molecular dentro de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

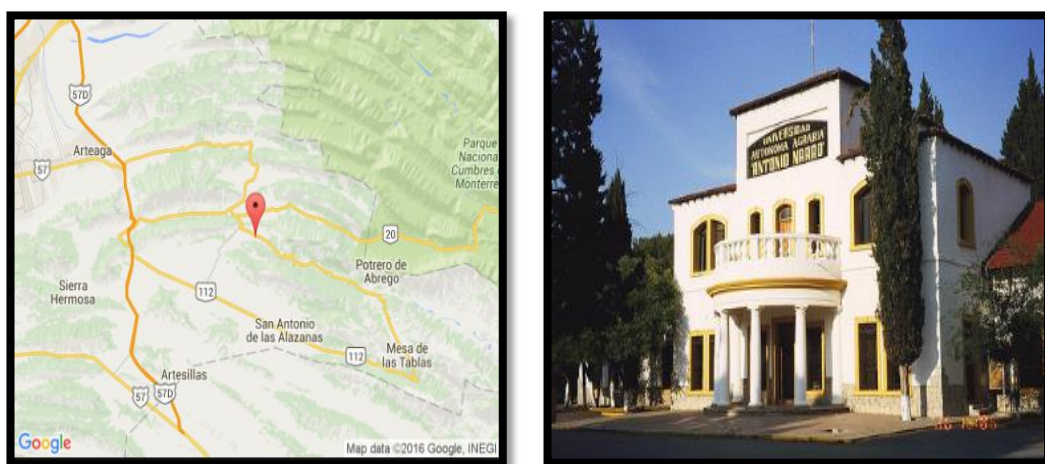


Fig. 2 Ubicación de sitio de muestreo y procesamiento de material vegetal.

Muestreo y Colecta de Material Vegetal

Para el cumplimiento del primer objetivo en abril del año 2015, se evaluó cual era la extensión de la enfermedad AP en una huerta de manzano de la variedad “Golden” en los Rancho Nuevo localidad de la sierra de Arteaga. Para ello se realizó una prospección visual en un total de 200 árboles de manzano y capulín distribuidos en una hectárea. En cada uno de los árboles se registró ausencia o presencia de los síntomas de la enfermedad. Se consideraba que un árbol estaba afectado, cuando mostraba síntomas característicos de escoba de brujas o enrollamientos suave de las hojas, brotes pequeños, cambio de color de las hojas entre otros.

Determinación de incidencia

Se estudió la incidencia de AP en 250 árboles en los que se habían registrado síntomas de la enfermedad. Dentro de la huerta se identificaron las dos especies de Rosaceas. En cada una de ellas se evaluó la incidencia de la enfermedad por un reconocimiento visual con un muestreo en W tomando muestras de 50 árboles por cada punto .

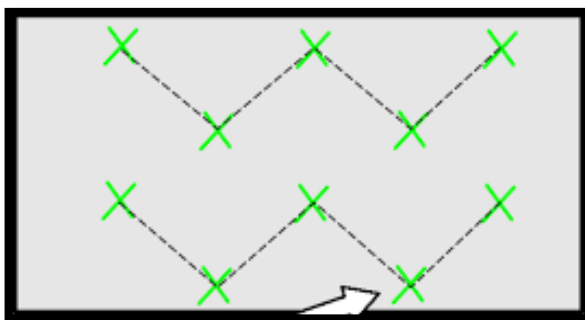


Fig. 2.1 Esquema de muestreo utilizado en la huerta para colecta de material.

Se registró la expresión de síntomas de la enfermedad en capulín. Estos árboles fueron escogidos por presentar síntomas de la enfermedad. Se escogieron arboles de manzanos aparentemente sanos.

Determinación de severidad

Durante el periodo 2014-2015 se muestreo mensualmente los arboles marcado para medir la severidad del síntoma en arboles infectados.

La estimación de severidad de la infección de los arboles dañados, se hizo mediante el sistema de evaluación de 4 clases recomendada en el manual de tratamientos fitosanitarios elaborado por la Comisión Nacional Forestal (CONAFOR) en 2005. Se delimita la copa del árbol y se considera el volumen de esta como el 100%; posteriormente se cuenta el número de distribución de escobas de bruja en la copa y se le asigna un valor numérico de acuerdo al volumen que ocupa la misma (figura 2.2). Este valor puede

variar 0% (sano) hasta más del 90%, y de acuerdo de este, se asigna el nivel de grado de infección, cuadro 1.

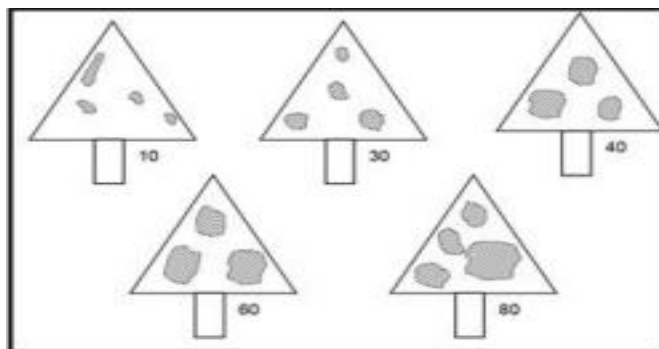


Fig. 2.2 Representación esquemática de varios porcentajes de infección, el área sombreada simboliza el ataque de escoba de bruja asociado a la proliferación de la manzana.

Cuadro 1. Volumen infectado de la copa en el sistema de 4 clases y grados de infección según (CONAFOR) en 2005.

Grado de infección Daño Volumen infectado de la copa (%)		
0	Sano	0
1	Leve	1-30
2	Medio	31-60
3	Fuerte	61-90

Preparación de muestras para observación al microscopio

Para la observación de diferencias en células del xilema y el floema de tejidos sanos y enfermos se realizaron cortes al micrótopo y su posterior observación a microscopio de luz.

Para hacer los cortes al micrótopo utilizamos una solución fijadora FAA (formaldehído, alcohol, ácido acético) en la cual sumergimos cortes de 1cm de hojas sanas y enfermas de manzano y capulín respectivamente. Se utilizó esta solución ya que se emplea normalmente en la fijación de tejidos vegetales. Aunque no preserva muy bien el citoplasma es un buen fijador para conservar las estructuras vegetales. A un porcentaje de 15%,70%,15%.

Deshidratamos las muestras: etanol. Con el siguiente proceso: 10 min H₂O destilada,,10 min etanol 70°,10 min etanol 80°,10 min etanol 90°,10 min etanol 96°,10 min alcohol absoluto.

Se utilizó como solvente orgánico: xileno ya que la parafina no es miscible con el alcohol por lo que se requiere este pasó puente con un solvente orgánico. El xileno es miscible con el alcohol absoluto y con la parafina.

Lo dejamos 5 min xileno y se procedió a dejar la Parafina (en estufa a 60 °C).se realizó un cambio de parafina a la hora y así se hicieron dos cambios más de parafina.

Se procedió a encastrar en parafina y hacer el bloque. Colocar parafina líquida en un molde metálico, fuera de la estufa, e introducir la muestra en él con la orientación deseada.

Partimos de nuestras muestras que habían sido fijadas e incluidas en parafina. Estas muestras se cortaron en secciones de unas 8 µm y adheridas a portaobjetos recubiertos con gelatina. Utilizamos la siguiente metodología:

- ✓ 1.- 2x10 min en xileno para desparafinar
- ✓ 2.- 2x10 min en etanol 100°
- ✓ 3.- 10 min en etanol 96°
- ✓ 4.- 10 min en etanol 80°
- ✓ 5.- 10 min en etanol 50°
- ✓ 6.- 5 min en H₂O destilada
- ✓ 8.- 15 min en agua corriente. Diferenciación.
- ✓ 9.- 2x5 min en H₂O destilada
- ✓ 10.- 0.5 a 2 min en Eosina al 0.2 %
- ✓ 11.- Tiempo variable en 70° para diferenciación
- ✓ 12.- 5 min en etanol 96°

- ✓ 13.- 2x10 min en etanol 100°
- ✓ 14.- 2x10 min en xileno
- ✓ 15.- Montado con medio de montaje

Teniendo ya el montaje se procedió hacer las observaciones pertinentes al microscopio electrónico.

Análisis Molecular

Extracción de ADN

Para la detección del fitoplasma se hizo una extracción de ADN de vegetales, usada por el Dr. Isidro Humberto Almeida León que consiste:

- ✓ Triturar 100mg de tejido en 1ml de solución de extracción 2 ME/CTAB precalentado a 65°C (2% P/V CTAB, 100 mM TRIS-HCL Ph 8.0, 20 mM EDTA Ph 8.0, 1.4 Mm NaCl 1% P/V polivinilpirrolidona 40 000) 0.2% B-mercaptoetanol.
- ✓ Mezclar con vortex o inversión
- ✓ Incubar a 65°C POR 45 min (antes de incubar se puede agregar proteinasa K)
- ✓ Agregar 500 MI cloroformo alcohol isoamilico 24:1
- ✓ Agitar fuerte por inversion
- ✓ Centrifugar a 12000 rpm 10min
- ✓ Recuperar la fase acuosa y agregar 1 vol. Igual de cloroformo alcohol isoamilico 24:1
- ✓ Agitar fuerte por inversión
- ✓ Centrifugar 12000rpm 10min
- ✓ Recuperar la fase acuosa y agra
- ✓ gar 0.6 vol de isopropanol dejar 1hr a toda la noche a -20 °C.
- ✓ Centrifugar 12 000 rpm 20min.
- ✓ Decantar y lavar pastilla con etanol al 70% centrifugar a 12 000 rpm 15 min. (repetir 2 veces).
- ✓ Dejar secar la pastilla
- ✓ Resuspender en agua MiliQ, agua inyectable o TE (50 A 100 MI)

Detección de fitoplasmas mediante aplicación de ADN

Se realizaron dos PCR. En la primera aplicación se utilizaron los cebadores universales P1 (Deng y Hiruki,1991) y P7 (Schneider et al.,1995) en cada reacción se utilizaron 2 μ l ADN, 12.5 μ l Taq , 1 μ l Primer forward , 1 μ l Primer reverse, 8.5 μ l Agua . La reacción de amplificación se llevó a cabo en un termociclador (Genius) con una pre desnaturalización a 95 °C durante 60s seguida de 45 ciclos que consistían en una desnaturalización a 95°C durante 10s , un hibridación de 45s con gradientes de temperatura 56.1°C ,58.2°C,60.2°C y una elongación a 72°C durante 45s y una extensión final a 72°C durante 4min .

Para la segunda amplificación, se utilizaron 2 μ l de la primera amplificación y se realizó paralelamente un PCR, con los cebadores específicos AP3 y AP5. Los reactivos y condiciones fueron los mismos que en la primera reacción.

Los productos de la amplificación de la PCR se analizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% con un tampón estándar TAE 1X (Sambrook *et al.*, 1989). El ADN fue teñido con bromuro de etidio y visualizado mediante luz ultravioleta en fotodocumentador.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La incidencia de la enfermedad, por prospección visual solo varía entre especies ya que el capulín tuvo un 0.5% de incidencia y en manzano se observaron síntomas leves de infección figura 3.



Fig. 3 Presencia de síntomas en árboles de Rancho Nuevo, en Cañón de los Lirios municipio de Arteaga Coahuila.

En capulín se observó que la masa vegetativa disminuyó y hubo una sobreproducción de “yemas apicales”. Los cambios de coloración en hojas (amarillamiento- enrojecimiento) fueron predominantes en el mes de agosto.

Hubo diferencias en el porcentaje de árboles que expresaron síntomas de estar infectados en la misma huerta. La incidencia de la enfermedad pudo variar en función de muchos factores como la edad de la plantación, el estado sanitario de la huerta, la ubicación geográfica, variaciones locales de temperatura y humedad, características edafológicas, así como la densidad de población del vector.

Durante los años 90’s los productores hacen referencia a la manifestación de mayor incidencia de síntomas de esta enfermedad, nuestras observaciones demuestran un 0.5% de árboles mostraron síntomas de estar afectadas por el fitoplasma. La aplicación de insecticidas y otros métodos de control contra el vector del fitoplasma.

La severidad de los daños causados por esta enfermedad es mas en capulín ya que hay árboles con un daño del 80%.

Al observar los cortes al microscopio se observaron diferencias significativas en las mediciones que se realizaron en tejidos sanos y enfermos tomando en cuenta que los tejidos son de la misma edad y se recolectaron bajo las mismas condiciones los tejidos sanos tiene células del floema son 2mm más pequeñas en comparación a las medidas obtenidas en tejidos con síntomas característicos de la enfermedad que se obtuvieron medidas 13.1 mm.

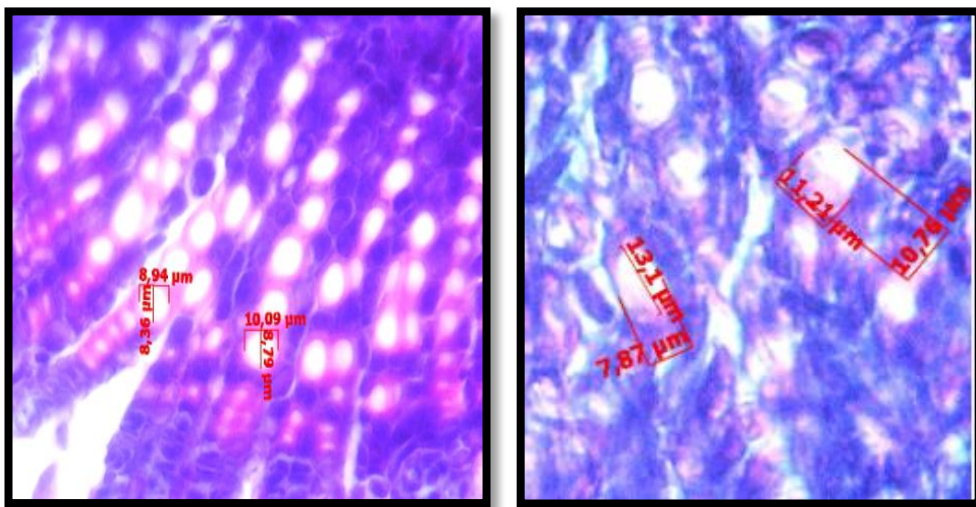


Fig. 4 Mediciones de floema en tejido sano y enfermo vistas al microscopio con objetivo de 40X.

Para la extracción de ADN se probaron dos métodos siendo el de Almeida el más efectivo ya que se obtuvo buena cantidad de ADN.

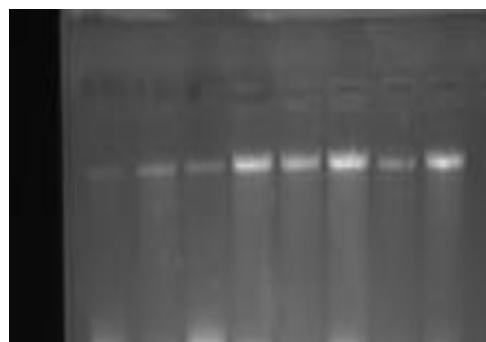


Fig. 5 Extracción de ADN de muestras de manzano y capulín con el método de Almeida.

Debido a que el método descrito en artículos científicos para la extracción de ADN para este fitoplasma no nos dio resultado optamos por el método utilizado por el Dr. Humberto Almeida De León.

Con este se obtuvo una buena cantidad de ADN para después hacer los PCR`s correspondientes.

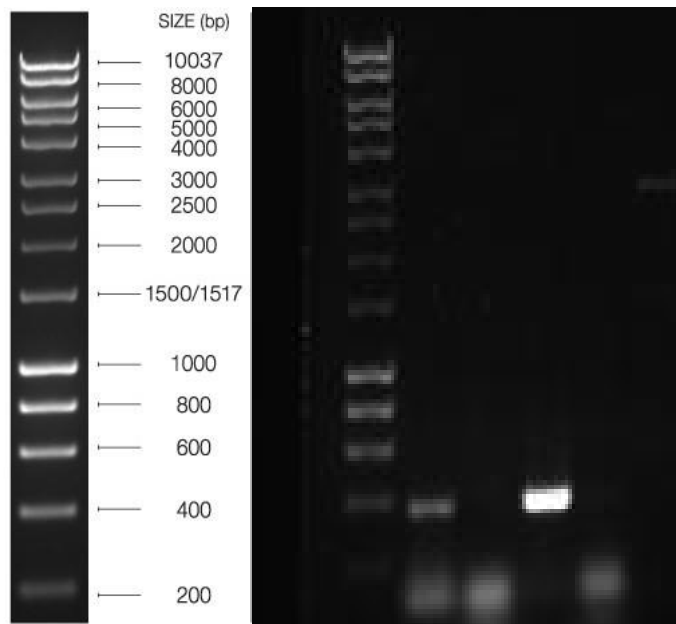


Fig. 6 Lectura de PCR de muestras analizadas de manzano y capulin.

En la figura podemos observar el resultado de la corrida de los geles del PCR una amplificación bien definida de la muestra 1 y 3 en la banda de 400pb con el primer par de primer f01 y r01 los resultados fueron posibles de obtener al meter gradientes de temperatura. La lectura nos muestra que a una temperatura de 52°C se observa una banda a 400 pb pero la muestra 3 es más definida a una temperatura de 56.1°C.

Ya que nosotros esperábamos una banda de 1100 pb se realizaron gradientes de temperatura tomando las mínimas y las máximas de las fichas técnicas de los primers utilizados y nos dio el resultado antes mencionados.

La utilización de un segundo par de primer AP3/AP5 específicos para el fitoplasma AP para correr un PCR anidado con gradientes de temperatura.

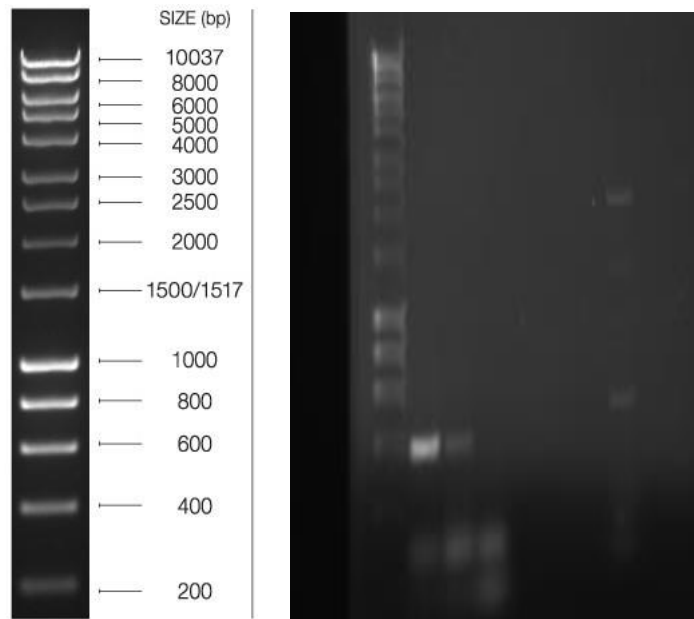


Fig. 7 Lectura de PCR anidada la muestra analizada.

Con los gradientes de temperatura 56.1, 58.2 y 60.2 °C corrimos dos PCR's uno con el primer par de primers y nos dio la misma banda en 400 pb en las primeras temperaturas a 60.2°C ya no obtenemos bandeado.

Después de haber obtenido bandas con el primer par de primer se realizó una PCR anidada con las primeras temperaturas no obtuvimos ninguna banda y obtuvimos una amplifica a 600pb y se observan bandas más arriba estas bandas se lograron con una temperatura de 60.2°C.

En un estudio realizado por Seemüller y colaboradores, se indica que la remisión de síntomas en peral no supone la desaparición del fitoplasma (Seemüller *et. al.*, 1998). Sin embargo, trabajos realizados en vid y en árboles frutales de hueso, indican que la recuperación de las plantas conlleva también la desaparición del fitoplasma de las hojas o la disminución de los mismos (Osler *et.al.*, 2003).

Con los resultados muestran que la mejor época para detectar el fitoplasma AP es marzo y abril ya que se obtiene un ADN de buena calidad y cantidad suficiente. Si nuestro trabajo es comparado con los resultados obtenidos por Seemüller 1984 en Alemania donde el mes apropiado es septiembre con un porcentaje de 100%.

CONCLUSIONES

Se reporta al capulín como especie susceptible a fitoplasma mostrando una sintomatología característica de este agente causal en el cañón de los lirios, municipio de Arteaga, Coahuila, México. La incidencia de los síntomas fue difícil de estimar ya que no todos los arboles expresaban síntomas.

Los síntomas son más severos en capulín, en comparación de los manzanos. Esto se debe al poco manejo que se le da esta especie al no considerarse con importancia económica y su utilización es como una barrera para el arribo de plagas.

Las mediciones realizadas nos dieron una perspectiva de la gravedad de los daños de la enfermedad a nivel nutrición ya que se encuentra afectando claramente el floema de los arboles dañados.

Se observó bandas que pueden corresponder a este fitoplasma. Para el estudio de PCR se observó que la extracción se hace más fácil de tejido aparentemente sano ya que de este tejido se pudo realizar mejor la extracción y PCR.

El manzano se considera un hospedero muy susceptible para la enfermedad ya que si hay presencia de bandas específicas en tejidos estudiados.

Las muestras que resulta mejor su análisis son los brotes jóvenes y en los meses de marzo y abril ya que no se observa ADN en al correr las geles en otros meses.

LITERATURA CITADA

- Agrios, G.N. Plant Pathology, 4th, pp. 457-470. G.N. Agrios (Ed). New York: Academic Press.
- Alma, A.; Bosco, D.; Danielli, A.; Bertaccini, A.; Vibio, M.; Arzone, A. 1997. Identification of phytoplasmas in eggs, nymphs and adults of *Scaphoideus titanus* Ball reared on healthy plants. Insect Molecular Biology (6): 115–121.
- Almeyda L., I. H. 1997. Detección molecular de fitoplasmas y su uso en el diagnóstico del amarillamiento letal del cocotero. Tesis de Doctor en Ciencias. Universidad Autónoma de Nuevo León, División de Estudios de Postgrado. San Nicolás de los Garza, N. L., México. 88 p.
- Anon, 2004. 'Candidatus Phytoplasma', a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 54(4):1243-1255.
- Ahrens, U., and Seemuller, E. 1992. Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. Phytopathology 82: 828-832.
- Avinent, L., and Llacer, G. 1995. Detection of phytoplasmas in fruit trees by polymerase chain reaction (PCR) in Spain. Acta Horticulturae 386: 480-483.
- Baric, S., Berger, J., Cainelli, C., Kerschbamer, C., Letschka, T., and Dalla Via, J. 2011. Seasonal colonization of apple trees by 'Candidatus Phytoplasma mali' revealed by a new quantitative TaqMan real-time PCR approach. European Journal of Plant Pathology 129(3): 455-467. DOI 10.1007/s10658-010-9706-x.
- Ben Khalifa, M., and Fakhfakh, H. 2011. Detection of 16S rDNA of 'Candidatus Phytoplasma mali' in plum decline in Tunisia. Canadian Journal of Plant Pathology: 33(3): 332-336.

- Berg, M., Davies, D.L., Clark, M.F., Vetten, H.J., Marcone, C., Seemüller, E., 1999. Isolation of the gene encoding an immunodominant membrane protein of the apple proliferation phytoplasma and expression and characterization of the gene product. *Microbiology* 145, 1937 – 1943.
- Berg, M., Seemüller, E., 1999. Chromosomal organization and nucleotide sequence of the genes coding for the elongation factors G and Tu of the apple proliferation phytoplasma. *Gene* 226, 103 -109.
- Berg, M., Yu, J., Melcher, U., Fletcher, J., 2000, *Spiroplasma citri putative* adhesin P89: development of serological and molecular markers, *Phytopathology* 90, 56.
- Bertaccini, A., Davies, R.E., Lee, I.M., Conti, M., Dolly, E.L., Douglas, S.M., 1990. Detection of chrysanthemum yellows mycoplasma-like organism by Dot hybridization and Southern blot analysis, *Plant Dis.* 74, 40-43.
- Bliefernich K, Krczal G, 1995. Epidemiological studies on apple proliferation disease in Southern Germany. *Acta Horticulturae*, 386:444-453.
- Blomquist, C.L., Barbara, D.J., Davies, D.L., Clark, M.F., Kirkpatrick, B.C., 2001. An immunodominant membrane protein gene from the western X-disease phytoplasma is distinct from those of other phytoplasmas. *Microbiology (reading)* 147(3). 571-580.
- Boudon – Padieu, E., Larrue, J., Caudwell, A., 1989. ELISA and Dot-blot detection of flavescence dorée-MLO in individual leafhopper vectors during latency and inoculative microbiology -19, 357-364.
- CABI. 2009. Crop protection compendium: global module. Commonwealth Agricultural Bureau International, Wallingford, UK <http://www.cabi.org/compedia/cpc/>.
- Carraro, L., Ferrini, F., Ermacora, P., and Loi, N. 2008. Infectivity of *Cacopsylla picta* (syn. *Cacopsylla costalis*), vector of 'Candidatus Phytoplasma mali' in north east Italy. *Acta Horticulturae* 781: 403-407.

- Chen, J., Chang, C.J., Jarret, R.L., 1992. DNA probes as molecular markers to monitor the seasonal occurrence of walnut witches broom mycoplasma-like organism. *Plant Dis.* 76, 1116 -1119.
- Condon, C., J., Philips, A., Fu, C., Squires, C.L., 1992. Comparison of the expression of the seven ribosomal RNA operons in *Escherichia coli*. *EMBO J.* 11, 4175 – 4185.
- Comisión Nacional Forestal (CONAFOR). 2005. Tratamientos contra plantas parasitas. Evaluación y tratamiento para muérdago verdadero (*Psittacanthus*) Manual de tratamientos fitosanitarios. Mexico D.F. 78p.
- Davies, D.L., Stickels, J.E., and Adams, A.N. 1986. A single occurrence of apple proliferation in England. *Plant Pathology* 35(3): 400-402.
- Doi, Y.; Terenaka, M.; Yora, K.; Asuyama, H. 1967. Mycoplasma or PPLT group-like microorganisms found in the phloem elements of plant infected with mulberry dwarf, potato witches' broom, or pawlonia witches' broom. *Annual Phytopathology Society of Japan* (33): 259.
- EPPO. 1997. Apple proliferation phytoplasma. In: Smith, McNamara, Scott, Holderness, and Burger (eds.) *Quarantine Pests for Europe II*. CABI and EPPO Publishing. Pp. 959-962.
- EPPO. 2014. PQR - EPPO database on quarantine pests (available online). <http://www.eppo.int>.
- EPPO Reporting Service. 2011/132 & 2011/133. First report of '*Candidatus Phytoplasma mali*' in Belgium & Updated situation of '*Candidatus Phytoplasma mali*' in Norway. No. 6. Paris, 2011-06-01.
- Firrao, G., Gobbi, E., Locci, R. 1994. Rapid diagnosis of apple proliferation mycoplasma-like organism using a polymerase chain reaction procedure. *Plant Pathology* 43: 669-674.
- Golino, D.A., Oldfield, G.N., Gumpf, D.J., 1989. Experimental hosts of the beet leafhopper – transmitted virescence agent. *Plant Dis.* 73: 850 – 854.

- Guttell, R.R., Larsen, N., Woese, C.R., 1994. Lessons from an evolving rRNA: 16S and 23S rRNA structures from a comparative perspective. *Microbiol. Rev.* 58, 10 - 26.
- Hanboonsong, Y.; Choosai, C.; Panyim, S.; Damak, S. 2002. Transovarial transmission of sugarcane white leaf phytoplasma in the insect vector *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura) *Insect Molecular Biology* (11): 97–103
- Hegab, A.M., and El-Zohairy, M.M. 1986. Retransmission of mycoplasma-like bodies associated with apple proliferation disease between herbaceous plants and apple seedlings. *Acta Horticulturae* 193: 343.
- IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team – Phytoplasma Taxonomy Group (IRPCM). 2003. ‘*Candidatus* Phytoplasma’, a taxon for wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology* 54: 1243-1255.
- Jarausch, W., Saillard, C., Dosba, F., and Bove, J.-M. 1994. Differentiation of mycoplasma-like organisms (MLOs) in European fruit trees by PCR using specific primers derived from the sequence of a chromosomal fragment of the apple proliferation MLO. *Applied and Environmental Microbiology* 60(8): 2916-2923.
- Jarausch, W., Saillard, C., Helliot, B., Garnier, M., and Dosba, F. 2000. Genetic variability of apple proliferation phytoplasmas as determined by PCR-RFLP and sequencing of a non-ribosomal fragment. *Molecular and Cellular Probes* 14: 17-24.
- Jarausch, B., Schwind, N., Jarausch, W., and Krczal, G. 2003. First report of *Cacopsylla picta* as a vector of apple proliferation phytoplasma in Germany. *Plant Disease* 87(10): 101.
- Jarausch, W., Peccerella, T., Schwind, N., Jarausch, B., and Krczal, G. 2004. Establishment of a quantitative real-time PCR assay for quantification of apple proliferation phytoplasmas in plants and insects. *Acta Horticulturae* 657: 415-420.

- Kirkpatrick BC, Smart C, Gardener S, Gao J-L, Ahrens U, MSurer R, Schneider B, Daire X, 1994. Phylogenetic relationship of plant pathogenic MLOs established by 16S/23S rDNA spacer sequences. IOM Letters, 3:228-229.
- Kison, H., Schneider, B., and Seemuller, E. 1994. Restriction fragment length polymorphisms within the apple proliferation mycoplasma-like organism. J. Phytopathology 141: 395-401.
- Kison, H., Kirkpatrick, C., and Seemuller, E. 1997. Genetic comparison of the peach yellow leaf roll agent with European fruit tree phytoplasmas of the apple proliferation group. Plant Pathology 46: 538-544.
- Kison, H., Seemüller, E., 2001. Differences in strain virulence of the European stone fruits yellows phytoplasma and susceptibility of stone fruit trees on various rootstocks to this pathogen. J. Phytopathol. 149, 553-541.
- Kollar, A., Seemüller, E., 1989. Base composition of the DNA of mycoplasma-like organisms associated with various plant diseases. J. Phytopathol. 127, 177, 186.
- Krczal, G., Krczal, H., and Kunze, L. 1988. *Fiebertiella florii* (Stal), a vector of apple proliferation agent. Acta Horticulturae 235: 99-106.
- Krizanac, I., Mikec, I., Budinscak, Z., Seruga Music, M., and Skoric, D. 2010. Diversity of phytoplasmas infecting fruit trees and their vectors in Croatia. Journal of Plant Diseases and Protection 117(5): 206-213.
- Kuan, C.P., Su, H.J., 1998. Development of cloned probes for phytoplasma associated with loofah witches broom. J. Phytopathol. 146, 309-313.
- Kuboyama, T., Chieh Chen, H., Lu Xiao Yun., Suawayanagi, T., Kanazawa, T., Kagami, T., Matsuda, I., Tsuchizaki, T., Namba, S. 1998. A plasmid isolated from phytopathogenic onion yellows phytoplasma and its heterogeneity – Microbe interact. 11(11), 1031 -1037.
- Kuo Chieh, Ho., 2001. Cloning and nucleotide sequence analysis of a *tuf* gene from loofah witches broom phytoplasma. Taiwania 46(4), 285 -294.

- Kuske, C.R, Kirkpatrick, B.C., Seemüller, E.,1991.differentiation of virescence phytoplasmas using western aster yellows mycoplasma –like organism chromosomal DNA probes and restriction fragment length polymorphism analysis J.Gen Microbiol.137,153 -159.
- Kuske, C.R, Kirkpatrick, B.C.,1992,Phylogenetic relation ships between the western aster yellows mycoplasma-like organism and the other procaryotes established by 16S rDNA gene sequence.int.J. Syst. Bacteriol. 42, 226 - 233.
- Lauer, U., and Seemuller, E. 2000. Physical map of the chromosome of the apple proliferation phytoplasma. Journal of Bacteriology 182(5): 1415-1418.
- Lee, I.M., Hammond, R.W., Davis, R.E., and Gunderson, D.E. 1993. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. Phytopathology 83(8): 834-842.
- Lee, I.M., Bertaccini, A., Vibio, M., and Gunderson, D.E. 1995. Detection of multiple phytoplasmas in perennial fruit trees with decline symptoms in Italy. Phytopathology 85: 728-735.
- Lepka, P., Stith,M.,Moll,E.,Seemüller,E.,1999.Effect of phytoplasmal infection on concentration and traslocation of carbohydrates and animo acids in periwinkle and tobacco physiol-Mol.Plant P.55,59 -68.
- Lefting, L.W.,Kirkpatrik,B.C.,2003.Cosmid cloning and sample sequencing of the genome of the uncultivable mollicute. Western X- disease phytoplasma using DNA purified by pulsed –field gel electrophoresis. FEMS Microbiol. Lett - 221(2),203,211.
- Lim, P.O., Sears, B.B., 1989. 16S rRNA sequence indicates that plant – pathogenic mycoplasma-like organisms are evolutionarily distinct from animal mycoplasmas J.Bacteriol.171,5901,5906.

- Lim, P. O., Sears, B.B.,1992.Evolutionary relationships of plant – pathogenic mycoplasma-like organism and *Acholeplasma laidlawi* deduced from two ribosomal protein gene sequences. J. Bacteriol.179,2606,2611.
- Lim ,P.O., Sears, B.B.,1992.Membrane properties of a plant –pathogenic mycoplasma-like organism.J. Bacteriol.174,682-686.
- Loi., N., Carraro, L., Mussetti, R., Furraro, G., and Osler, R. 1995. Apple proliferation epidemics detected in scab-resistant apple trees. Journal of Phytopathology 143(10): 581-584.
- Loi, N., Ermacora, P., Carraro, L., Osler, R., and Chen, T.A. 2002. Production of monoclonal antibodies against apple proliferation phytoplasma and their use in serological detection. European Journal of Plant Pathology 108: 81-86.
- Lorenz, K.-H., Schneider, B., Ahrens, U., and Seemuller, E. 1995. Detection of the apple proliferation and pear decline phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and nonribosomal DNA. Phytopathology 85” 771-776.
- Malisano, G., Furraro, G., and Locci, R. 1996. 16S rDNA-derived oligonucleotide probes for the differential diagnosis of plum leptonecrosis and apple proliferation phytoplasmas. EPPO Bulletin 26: 421-428.
- Maürer, R.,Seemüller,E.,Sindair,W.A., 1993.Genetic related ness of mycoplasma-like organisms affecting elm, alder,and ash in Europe and North America. Phyto –pathology. 83,971-976.
- McCoy, R.E., Caudwell, A., Chang, C.J., Chen, T.A., Chykowski, L.N., Cousin, M.T., Dale, J.L., de Leeuw, G.T.N., Golino, D.A., Hackett, K.J., Kirkpatrick, B.C., Marwitz, R., Petzold, H., Sinha, R.C., Sugiura, M., Whitcomb, R.F., Yang, I.L., Zhu, B.M., and Seemuller E. 1989. Plant diseases associated with mycoplasma-like organisms. In: The Mycoplasmas, Vol. 5. Whitcomb, R.F., and Tully, J.G. (ed.). Academic Press, New York.
- MengLing,W., TunTschu Ch., Laring Chour W., Chuen Hsu,F.,2002.Rapid detection of phytoplasma associated with paulownia witches broom using a

- nonradioactive DNA probe and PCR based assay. *Taiwan J. Forest. Sci.* 172,123,133.
- Meline, R.G., Ramasso, E., Lenzi, R., Masenga, V., Sarinelu S., Clark, M.F., 1995. Pre – and Post – embedding immunogold labeling and electron microscopy in plant host tissues of three antigenically unrelated MLOs: primula yellows, tomato big bud and bermudagrass whiteleaf. *Netherlands J. plant pathol.* 101,57-62.
- Mergenthaler, E., Viczian, U., Fodor, M., Sule, S., 2001. Isolation and expression of an immunodominant membrane protein gene of the ESFY phytoplasma for antiserum production. *Acta Hort.* 550 (2) 335-360.
- Morton, A., Davies, D.L., Blomquist, C.L., Barbara, D.J., 2003. Characterization of homologues of the apple proliferation immunodominant membrane protein gene from three related phytoplasmas. *Mol. plant pathol.* 4(2),109-114.
- Musetti, R., Scaramaglia S., Vighi, C., Pressaco, L., Favali, M.A., 1999. The involvement of polyamines in phytoplasma infected periwinkle *Cantharus roseus* L. *bioSyst.* 133, 37-45.
- Musetti, R., Paolacci, A., Ciaffi, M., Tanzarella, O.A., Polizzoto, R., Tubaro, F., Mizzau, M., Ermacora, P., Badiani, M., and Osler, R. 2010. Phloem cytochemical modification and gene expression following the recovery of apple plants from apple proliferation disease. *Phytopathology* 100: 390-399.
- Nakashima, K., Hayashi, T., 1995. Extrachromosomal DNAs of rice yellow dwarf and sugarcane White leaf phytoplasmas. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan* 61, 456-462.
- Neimark, H.C., Kirkpatrick, B.C., 1993. Isolation and characterization of full length chromosomes from non culturable plant pathogenic mycoplasma-like organisms. *Mol. Microbiol.* 7,21-28
- Nemeth, M. 1986. *Virus, Mycoplasma, and Rickettsia Diseases of Fruit Trees.* Budapest, Hungary.
- Nishigawa, H., Miyata, S.I., Oshima, K., Sawayanagi, T., Komoto, A., 2001. In planta expression of a protein encoded by the extrachromosomal DNA of a

phytoplasma and related to geminivirus replication proteins. *Microbiology*. 507-513.

Pedrazzoli, Ciccotti, A.M., Bianchedi, P.L., Salvadori, A., and Zorer, R. 2008a. Seasonal colonization behavior of *Candidatus* Phytoplasma mali in apple trees in Trentino. *Acta Horticulturae* 781: 483-488.

Pedrazzoli, F., Filippi, M., Deromedi, M., Bragagna, P., Battocletti, I., Bianchedi, P.L., and Ciccotti, A.M. 2008b. Apple proliferation transmission by grafting in different periods of the year. *Acta Horticulturae* 781: 489-493.

Poggi Pollini, C., Bissani, R., and Glunchedi, L. 2001. Occurrence of European stone fruit yellows phytoplasma (ESFYP) infection in peach orchards in Northern-Central Italy. *Journal of Phytopathology* 149(11-12): 725-730.

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

Schneider, H., 1970. Graft transmission and host range of pear decline causal agent, *Phytopathology* 60, 204-207.

Schneider, B., Seemuller, E., Smart, C.D., Kirkpatrick, B. 1995. Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas. *In*: Razin S., and Tully, J.D. (eds.) *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmatology*. Pp. 369-380. Academic Press, San Diego, CA.

Schneider, B., Marcone, C., Kampmann, M., Ragozzino, A., Lederer, W., Cousin, M.T., and Seemuller, E. 1997. Characterization and classification of phytoplasmas from wild and cultivated plants by RFLP and sequence analysis of ribosomal DNA. *European Journal of Plant Pathology* 103: 675-686.

Seemuller, E. 1976. Investigation to demonstrate mycoplasma-like organisms in diseased plants by fluorescence microscopy. *Acta Hort* 67: 109-112.

- Seemuller, E., Schaper, U., and Zimbelmann, F. 1984. Seasonal variation in the colonization patterns of mycoplasma-like organisms associated with apple proliferation and pear decline. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz (Journal of Plant Disease and Protection)* 91(4): 371-382.
- Seemuller, E. 1990. Apple proliferation. In: A.L. Jones and H.S. Aldwinckle (eds.) *Compendium of Apple and Pear Diseases*. American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. Pp. 67-68.
- Seemuller, E., Schneider, B., Maurer, R., Ahrens, U., Daire, X., Kison, H., Lorenz, K.-H., Firrao, G., Avinent, L., Sears, B.B., and Stackebrandt, E. 1994. Phylogenetic classification of phytopathogenic mollicutes by sequence analysis of 16S ribosomal DNA. *International Journal of Systematic Bacteriology* 44(3): 440-446.
- Seemuller, E., Marcone, C., Lauer, U., Ragozzino, A., and Goschl, M. 1998. Current status of molecular classification of the phytoplasmas. *Journal of Plant Pathology* 80(1): 3-26.
- Seemüller, E., Garnier, M., and Schneider, B. 2002. Mycoplasmas of plants and insects. in *Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas*, S. Razin and R. Herrmann eds. Kluwer Academic/Plenum Publishers, Dordrecht, Netherlands Pgs. 91-116.
- Seemuller, E., and Schneider, B. 2004. '*Candidatus Phytoplasma mali*', '*Candidatus Phytoplasma pyri*', and '*Candidatus Phytoplasma prunorum*', the causal agents of apple proliferation, pear decline, and European stone fruit yellows, respectively. *International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology* 54: 1217-1226.
- Seemuller, E., and Schneider, B. 2007. Differences in virulence and genomic features of strains of '*Candidatus Phytoplasma mali*' the apple proliferation agent. *Phytopathology* 97: 964-970.
- Seemuller, E., Moll, E., Schneider, B. 2008. Apple proliferation resistance of *Malus sieboldii*-based rootstocks in comparison to rootstocks derived from other *Malus* species. *European Journal of Plant Pathology* 121: 109-119.

- Seemuller, E., Kiss, E., Sule, S., and Schneider, B. 2010. Multiple infection of apple trees by distinct strains of '*Candidatus Phytoplasma mali*' and its pathological relevance. *Phytopathology* 100: 863-870.
- Seemüller E, 1990. Apple proliferation. In: Compendium of apple and pear diseases. St Paul, Minnesota, USA: American Phytopathological Society, 67-68.
- Seemüller E, Schneider B, 2004. '*Candidatus Phytoplasma mali*', '*Candidatus Phytoplasma pyri*' and '*Candidatus Phytoplasma prunorum*', the causal agents of apple proliferation, pear decline and European stone fruit yellows, respectively. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(4):1217-1266.
- Seemüller E, Schneider B, Maürer R, Ahrens U, Daire X, Kison H, Lorenz KH, Firrao G, Avinent L, Sears BB, Stackebrandt E, 1994. Phylogenetic classification of phytopathogenic mollicutes by sequence analysis of 16S ribosomal DNA. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44(3):440-446
- Tedeschi R, Alama A, 2004. Transmission of apple proliferation phytoplasma by *Cacopsylla melanoneura* (Homoptera: Psyllidae). *Journal of Economic Entomology*, 97(1):8-13.
- Weisburg, W. G.; Tully, J. G; Rose, D. L.; PetzeL, J. P.; Oyaizu, D. H.; Yang, L.; Mandelco, J.; Sechrest, T. G; Lawrence, J.; Van Etten, J.; Maniloff, C. R.; Whittaker, R. H. 1989. New Concepts of Kingdom of organisms. *Science* (163): 150–161
- Woese, C. R.; Maniloff, J.; Zablen, L. B. 1980. Phylogenetic analysis of the mycoplasmas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (77): 494–498.
- Woese, C. R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* (51): 221–271.
- Woese, C. R.; Kandler, O.; Wheelis, M. L. 1990. Toward a natural system of organism: proposal for the domains Archaea, Bacterial and Eucarya. *Proc. Natl. Sc. USA* (87): 4576–4579.