



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE POSTGRADO

**TRANSMISIÓN DE FITOPLASMAS POR INSECTOS AUQUENORRINCOS
CAPTURADOS EN VIÑEDOS EN CHILE**

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS, MENCIÓN SANIDAD VEGETAL

MARÍA VALERIA LONGONE

DIRECTOR DE TESIS

NICOLA FIORE

PROFESORES CONSEJEROS

MARCELA ESTERIO G.

AUDREY GREZ

SANTIAGO DE CHILE

Julio, 2013
UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE POSTGRADO

Título

Transmisión de fitoplasmas por insectos auquenorrincos capturados en viñedos en Chile.

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

Nombre del Alumno
María Valeria Longone

DIRECTOR DE TESIS

Nicola Fiore
Ingeniero Agrónomo, Dr. Cs. Agr.

CALIFICACIONES

Aprobado

PROFESORES CONSEJEROS

Marcela Esterio G.
Ingeniero Agrónomo, M. Sc.

Aprobado

Audrey Grez
Licenciada en Biología, M. Sc.

Aprobado

Santiago de Chile

La presente tesis recibió financiamiento del Proyecto Fondecyt N° 11090180:
“Epidemiological study of phytoplasmas affecting grapevine in Chile”.

Dedicatoria

A mis padres por creer en mí y apoyarme en todas mis andanzas.
A mis sobrinos Facundo, Valentina y Benjamín que son el centro de mi vida.

Agradecimientos

En primer lugar agradecer a Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) por becarme y darme la posibilidad de perfeccionarme a nivel profesional.

A mi director Dr. Nicola Fiore por haberme brindado toda su experiencia y conocimientos en el transcurso de esta investigación.

A mis amigas de laboratorio Andrea, Claudia, Lucía y Ximena por los momentos vividos, las charlas, los consejos, los trabajos compartidos y su ayuda incondicional.

A Dr. Alan Zamorano “genio loco” quien me ha guiado y ayudado en todo momento con sus conocimientos científicos, Rock y amistad.

A mi amiga Francia por abrirme la puerta de su casa donde siempre me sentí como en casa y compartir el cariño de Martina. Muchas gracias por ayudarme en el momento más complicado que pase y por aquellos en los que nos divertimos muchos.

A Dolly, amiga luchadora, con quien compartí muchas horas de estudios, días de alegrías y tristezas, meses de convivencias entre tinticos y arepas.

A mi querida Evelyn, con quien compartí largas charlas en compañía del mate.

A la pequeña Maye quien le dio el toque de niñez a la vida en este tiempo de postgrado.

A mi primo Alejandro y tía Mirta quienes estuvieron siempre presentes a pesar de la distancia.

A mi nona Elena especialmente por el simple hecho de estar.

Finalmente, pero no menos importantes, a mis amigas, a las de siempre, a las de lejos, a las de cerca y a las que encontré en el camino.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	5
I. Antecedentes generales.....	5
II. Enfermedades que afectan a la vid en Chile.....	5
III. Fitoplasmas	6
III.1. Origen.....	6
III.2. Características específicas	6
III.3. Identificación y clasificación de fitoplasmas	7
III.4. Sintomatología general.....	7
III.4.1. Síntomas de fitoplasmas en vid.	7
III.5. Transmisión de fitoplasmas.....	8
III.5.1 Transmisión por insectos vectores.....	8
III.5.2. Mecanismo de transmisión	9
III.6. Relación fitoplasma-insecto	11
IV. Importancia de las enfermedades causadas por fitoplasmas en la vid.....	11
V. Situación de los fitoplasmas en vid en Chile	12
VI. Medidas de control de fitoplasmas	14
MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
I. Muestreo	15
II. Actividades en laboratorio e invernadero.....	17
II.1. Caracterización taxonómica de especies y su abundancia relativa.....	17
II.2. Pruebas de transmisión con cicadélidos.....	17
II.2.1. Obtención de plantas.....	17
II.2.2. Armado de jaulas	19
II.2.3. Ensayos de transmisión.....	19

II.3. Caracterización molecular de fitoplasmas en vides, vincas y langostinos	20
II.3.1. Extracción de ADN total.....	20
II.3.2. Detección de fitoplasmas por nested-PCR.....	21
II.3.3. Clonamiento	24
II.3.4. Obtención de secuencias.	25
II.3.5. Identificación molecular	25
RESULTADOS	26
I. Caracterización de especies y abundancia relativa.....	26
II. Pruebas de transmisión.....	30
II.1. Síntomas de fitoplasmas en plantas de vinca y vid.....	32
II.2. Detección de fitoplasmas por nested – PCR.....	40
II.3. Identificación de fitoplasmas por análisis de secuencia y RFLP <i>in silico</i>	42
DISCUSIÓN	50
CONCLUSIONES	52
BIBLIOGRAFÍA	53
ANEXO I.....	61
ANEXO II.....	62
ANEXO III	64
ANEXO IV	65

RESUMEN

Durante el año 2011, desde enero hasta mayo (excepto febrero), se realizó una prospección de insectos hemípteros auquenorrincos en viñedos infectados por fitoplasmas, dos ubicados en la Región Metropolitana (Alto Jahuel y Pirque) y uno en la de Valparaíso (Casablanca). Se determinó que las especies más abundantes encontradas corresponden a cicadélidos adultos de *Amplicephalus curtulus* Linnavuori & De Long y *Paratanus exitiosus* Beamer. Mensualmente (de septiembre de 2011 a mayo 2012), en los tres viñedos se capturaron estas dos especies para realizar las pruebas de transmisión en jaulas entomológicas utilizando plantas de vid cv. Cabernet Sauvignon y plantas de vinca (*Catharanthus roseus* L.) obtenidas desde semillas. Las capturas se realizaron utilizando una red entomológica.

Individuos adultos de *P. exitiosus* capturados en los viñedos transmitieron el fitoplasma 16SrIII-J (X-disease group) a plantas de vinca, quienes presentaron los siguientes síntomas: virescencia, filodia, amarilleces en hojas y proliferación de yemas adventicias (“escoba de bruja”). También, se demostró que *P. exitiosus* transmitió el mismo fitoplasma a plantas de vid, las que presentaron entrenudos cortos con hojas deformadas y enrolladas hacia el envés.

Los resultados del presente trabajo indican, por primera vez, que *P. exitiosus* es vector del fitoplasma perteneciente al subgrupo ribosomal 16SrIII-J.

Palabras claves: Auchenorrhyncha, Nested-PCR/RFLP, X-disease group

ABSTRACT

In 2011, from January to May (except February), was carried out a survey of insects Hemiptera, Auchenorrhyncha in vineyards infected by phytoplasmas; two vineyards were located in the Metropolitana Region (Alto Jahuel and Pirque) and one vineyard was located Valparaiso Region (Casablanca). It was determined that the most abundant species found were adult leafhoppers of *Amplipcephalus curtulus* Linnavuori & De Long and *Paratanus exitiosus* Beamer. Monthly (from September 2011 to May 2012), from the same three vineyards, these two species were captured for transmission trials in grapevine cv. Cabernet Sauvignon and periwinkle (*Catharanthus roseus* L.) seedlings placed in entomological cages. The insects were captured by sweeping with an entomological net. *Paratanus exitiosus* adult individuals captured in the vineyards have transmitted the phytoplasma 16SrIII-J (X-disease group) to periwinkle plants, which showed virescence, phyllody, yellowing of leaves and adventitious buds proliferation (“witch broom”). Also, it was shown that *P. exitiosus* transmitted the same phytoplasma to grapevine plants that exhibited short internodes and downward leaf rolling. The results of this study indicate, for the first time, that *P. exitiosus* is vector of the phytoplasma belonging to ribosomal subgroup 16SrIII-J.

Keywords: Auchenorrhyncha, Nested-PCR/RFLP, X-disease group

INTRODUCCIÓN

En el 2010 en Chile se registraron 116.830,78 hectáreas de vid para vino, lo que indica un incremento del 4,8% de la superficie plantada en relación al año 2009. Por otro lado, la producción de vino en el 2012 fue de 1.255.371.040 litros, o sea, un 20% más con respecto al año 2011. Estas cifras demuestran la enorme importancia que el sector vitivinícola representa para la agricultura chilena.

El éxito del cultivo depende, entre otros, de las condiciones fitosanitarias de los viñedos. Investigaciones realizadas en la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile, han permitido asociar los daños observados en campo con la presencia de fitoplasmas. La deshidratación de las bayas, la disminución de la producción y el acortamiento del ciclo productivo son los principales problemas observados en las vides infectadas.

El control de los fitoplasmas se basa exclusivamente en la prevención de la infección. Por lo tanto, comprobada la presencia de estos patógenos en las zonas productivas de mayor importancia vitivinícola del país, en las regiones de Valparaíso, Libertador General Bernardo O'Higgins, Maule y Metropolitana, se plantea, a través de este estudio, investigar sobre los vectores asociados presentes en el cultivo, con la finalidad de ofrecer herramientas para la prevención de la difusión de las enfermedades causadas por fitoplasmas.

Por lo tanto, se propone la siguiente hipótesis:

"Los insectos auquenorrincos capturados en viñedos en Chile, son vectores de fitoplasmas".

El objetivo general de la tesis fue "Determinar si las dos especies de insectos auquenorrincos más abundantes en los viñedos, son vectores de fitoplasmas".

Objetivos específicos:

- Determinar la abundancia relativa de las especies de insectos auquenorrincos capturados en tres viñedos.
- Evaluar, a través de pruebas de transmisión, si las dos especies de insectos auquenorrincos más abundantes en los tres viñedos, transmiten fitoplasmas en vinca y vid.
- Detectar e identificar, a través de técnicas moleculares, fitoplasmas en insectos auquenorrincos, plantas de vid y vinca provenientes de las pruebas de transmisión.

La información generada constituirá la base para mejorar el manejo de los viñedos con el fin de prevenir las enfermedades producidas por fitoplasmas en la vid, contribuyendo a mantener libre de estos fitopatógenos el valioso germoplasma presente actualmente en Chile.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

I. Antecedentes generales

La vitivinicultura es una actividad económica importante para Chile debido a la producción de vinos de calidad, que son reconocidos a nivel mundial. La zonificación en el país se distribuye en cinco grandes áreas vitícolas (Atacama, Coquimbo, Aconcagua, Valle Central y Región Sur).

Según el catastro vitícola nacional, en el año 2010 en Chile existían 116.830,78 hectáreas de vides para vinificación, el 72,4% corresponde a variedades tintas y el 27,6% a blancas. Las variedades más importantes son Cabernet Sauvignon, Chardonnay, Sauvignon Blanc, Merlot y Carménère. En el periodo 2009-2010, la superficie cultivada de vid con propósito enológico aumentó en un 4,8% (SAG, 2010). La producción de vino en 2012, alcanzó a 1.255.371.040 litros, lo que implica un aumento del 20% con respecto al año 2011 (SAG, 2012).

Para garantizar en el tiempo la producción de vinos de calidad es fundamental realizar un manejo agronómico equilibrado del viñedo, partiendo por el uso de plantas que posean buenas condiciones fitosanitarias.

II. Enfermedades que afectan a la vid en Chile

En Chile, el cultivo de la vid (*Vitis vinifera* L.) es afectado por varias enfermedades. Entre éstas, las causadas por hongos que afectan follaje y bayas son el “oídio” de la vid, *Uncinula necator* (Schwein) (Mujica y Vergara, 1980) y la “pudrición gris”, causada por *Botrytis cinerea* Pers. (Auger y Esterio, 1997). Dentro de las enfermedades que afectan a la madera, se mencionan el “pie negro” causado por *Cylindrocarpon macrodidymum* Halleen, Schroers & Crous (Auger *et al.*, 2007), “enrollamiento clorótico”, cuyo agente causal es *Fomitiporella vitis* (Auger *et al.*, 2005a) y el síndrome de declinación y muerte de plantas jóvenes, por *Phaeoconiella chlamydospora* y *Phaeoacremonium aleophilum* (Auger *et al.*, 2004; 2005b).

La vid también se ve afectada por virus y bacterias. Dentro de los virus detectados en Chile, se han identificado el *Grapevine fanleaf virus* (GFLV), *Grapevine leafroll-associated virus 1, 2, 3, 4, 5, 7 y 9* (GLRaV-1, 2, 3, 4, 5, 7, 9), *Grapevine fleck virus* (GFkV), *Grapevine virus A* (GVA), *Grapevine virus B* (GVB), *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* (GRSPaV) y el *Grapevine Syrah virus 1* (GSyV-1) (Engel *et al.*,

2008; Escobar *et al.*, 2008; Fiore *et al.*, 2008; Engel *et al.*, 2010 a, b). Entre las bacterias que afectan a la vid, se encuentra *Rhizobium vitis* (= *Agrobacterium vitis*) que causa la agalla de corona de la vid (Cruz Aguayo, 2004). La amarillez en la vid, se asocia a procariotas conocidos como fitoplasmas. Esta es una enfermedad grave que afecta las zonas vitícolas de mayor importancia en el mundo. La presencia de fitoplasmas en Chile fue indicada por primera vez en 1988 por Caudwell en base a la observación de síntomas.

III. Fitoplasmas

III.1. Origen

Los fitoplasmas se descubrieron en 1967, cuando se observaron por primera vez a través del microscopio electrónico. Se determinó que los síntomas de las plantas conocidas como “Amarilleces” (Yellow Diseases) eran producidas por procariotas y no por virus, como se creía hasta ese momento (Doi *et al.*, 1967).

El descubrimiento de estos organismos que eran parecidos a los micoplasmas, causantes de enfermedades en animales, originó el inicio de su estudio. Por todo esto, en sus comienzos, se los denominaron organismos similares a micoplasma (Mycoplasma-like organisms, MLOs) y se mantuvo ese término hasta 1994. Luego, el Comité de Taxonomía de los Mollicutes de la “International Organization for Mycoplasmaology”, estableció oficialmente llamar “fitoplasmas” a estos patógenos (Cousin, 1995). En el 2004, para la clasificación formal de los fitoplasmas, se aceptó la constitución de un nuevo género '*Candidatus Phytoplasma*' (IRPCM, 2004).

III.2. Características específicas

Los fitoplasmas son procariotas unicelulares pertenecientes a la Clase Mollicutes, carecen de pared celular, son pleomórficos, poseen resistencia a la penicilina y son sensibles a tetraciclina. Estos presentan un genoma pequeño de 530-1350 Kb y bajo contenido de los nucleótidos guanina y citosina (G+C) (IRPCM, 2004).

Estos patógenos habitan en los insectos vectores y en el floema de las plantas. Los fitoplasmas invaden los tubos cribosos de las plantas y aquellos insectos vectores que son capaces de alimentarse en este tejido, adquieren el patógeno y pueden transmitirlo a plantas sanas (Hogenhout *et al.*, 2008).

III.3. Identificación y clasificación de fitoplasmas

Debido a que los fitoplasmas sólo recientemente se han logrado cultivar *in vitro* (Contaldo *et al.*, 2012), el desarrollo de la biología molecular ha sido fundamental para la identificación de estos patógenos. Bertaccini *et al.* (2007) menciona que la extracción de ADN se debe realizar desde nervaduras y floema de las plantas, y sostiene que la cantidad de ADN de fitoplasmas es inferior a 1% del total de ADN extraído de los tejidos, situación que dificulta su detección. Para aumentar la sensibilidad de la detección es necesario utilizar la técnica nested (anidada)-PCR y para la identificación el análisis del polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP). La identificación y clasificación de los fitoplasmas según grupos y subgrupos ribosomales, se basa principalmente en el análisis de la secuencia 16S rDNA que corresponde al gen que codifica para el RNA ribosomal de la subunidad 16 (Lee *et al.*, 1998). También se han estudiados otros genes idóneos para la detección y identificación de fitoplasmas, como el gen *tuf* que codifica para el factor de elongación, la región intergénica 16S-23S rRNA, el gen *secY* que codifica para la subunidad de una translocasa y el gen que codifica para la proteína ribosomal (rp) (Bertaccini, 2007; Lee *et al.*, 2009).

III.4. Sintomatología general

Los síntomas más frecuentes inducidos por fitoplasmas en las diferentes especies vegetales son amarillamiento, enrojecimiento precoz de las hojas, esterilidad de las flores, virescencia (los pétalos adoptan un color verde), filodia (transformación de los órganos florales en estructuras foliares), proliferación de yemas adventicias que dan lugar al síntoma típico llamado “escoba de bruja”, enanismo generalizado, enrollamientos de las hojas y decaimiento general de la planta (Lee *et al.*, 2000).

III.4.1. Síntomas de fitoplasmas en vid. Caudwell (1988), informó sobre la presencia de fitoplasmas en la vid en Chile, sobre la base de las observaciones de síntomas. Sin embargo, varios años después, con la ayuda de análisis de laboratorio, se pudo identificar a los fitoplasmas asociados a la vid en Chile (Herrera y Madariaga, 2003; Bertaccini *et al.*, 2004; Gajardo *et al.*, 2009). Observaciones realizadas en terreno durante cinco años, revelaron la presencia de un número significativo de plantas que presentaban síntomas típicos de amarilleces. Desde fines de enero y durante todo el otoño,¹ las vides infectadas pueden presentar hojas enrolladas hacia el envés de la lámina, volviéndose levemente amarillas o rojizas, según se trate de variedades de uvas blancas o rojas, respectivamente. La coloración anormal puede estar limitada sólo a las nervaduras principales o en algunos sectores de la lámina de la hoja, pero con más frecuencia se extiende a toda la hoja. Las bayas comienzan a deshidratarse y los racimos se secan; los sarmientos infectados se vuelven flexibles, debido a la lignificación parcial de los mismos (Gajardo *et al.*, 2009).

¹ Fiore, Nicola. Dr académico de Universidad de Chile nfiore@uchile.cl (comunicación personal)

Los sarmientos que conservaron el color verde, cuando se exponen a las bajas temperaturas invernales, tienden a necrosar y mueren y en plantas muy afectadas, produce decaimiento y muerte de las mismas (Caudwell, 1993; Belli *et al.*, 2010).

III.5. Transmisión de fitoplasmas

Agrios (2005) define el término “transmisión” como la transferencia de un virus u otro agente patógeno de una planta a otra. Los fitoplasmas, como parásitos estrictos, deben vivir en el huésped, por lo tanto, la transmisión de este patógeno puede ocurrir a través de la propagación de material vegetal (injerto, estacas y micropropagación). También se transmite por la planta parásita *Cuscuta* spp. Esta transmisión generalmente es importante sólo para los estudios de investigación, ya que permite la transferencia de fitoplasmas entre una plantas infectada a una sana, como la vinca (*Catharanthus roseus* L.), que es utilizada como planta indicadora y para el mantenimiento de la mayoría de los aislados de referencia de fitoplasmas. Además, se ha comprobado la transmisión por semillas en algunas especies de plantas (tomate, alfalfa y naranja). Sin embargo, el principal factor de dispersión del patógeno es por insectos vectores (Lee *et al.*, 2000; Bertaccini, 2007; Bertaccini y Duduk, 2009).

III.5.1 Transmisión por insectos vectores. El orden Hemiptera, según Weintraub y Beanland (2006), posee varias características por las cuales sus miembros son eficientes vectores de fitoplasmas:

- a) Son insectos hemimetábolos, es decir, las ninfas y adultos se alimentan de la misma planta. A menudo tanto ninfas como adultos pueden transmitir fitoplasmas.
- b) Ellos se alimentan de forma específica y selectiva en ciertos tejidos vegetales, lo que los hacen eficientes vectores de patógenos que residen en esos tejidos.
- c) Su alimentación es no destructiva; la inoculación se desarrolla con éxito al sistema vascular de la planta sin dañar los tejidos conductores y sin provocar respuestas defensivas por parte de la planta.
- d) Tienen una relación propagativa y persistente con el fitoplasma. Esto significa que el fitoplasma se multiplica en el cuerpo del vector y la capacidad de infección permanece en los insectos durante toda su vida.

Los fitoplasmas están limitados al floema, por lo tanto, sólo aquellos insectos que se alimentan en éste tejido vascular pueden adquirir y transmitir el patógeno (Weintraub y Beanland, 2006; Wilson y Weintraub, 2007). Hasta el momento pocas especies de insectos han sido confirmadas como vectores de fitoplasmas y se distribuyen en solo tres grupos taxonómicos: a) El suborden Auchenorrhyncha, la superfamilia Membracoidea,

familia Cicadellidae, que contiene el mayor número de especies vectoras conocidas hasta el momento; b) En el mismo suborden, la superfamilia Fulgoroidea, constituidas por cuatro familias de insectos vectores (Cixiidae, Delphacidae, Derbidae y Flatidae) y c) el suborden Sternorrhyncha, en el que sólo dos géneros de la familia Psyllidae se confirman como vectores (Weintraub y Beanland, 2006) (Anexo I).

Wilson y Weintraub (2007) plantean que más del 75% de los cicadélidos considerados vectores de fitoplasmas pertenecen a la subfamilia Deltocephalinae (familia Cicadellidae). Estos autores afirman que el hábito de alimentación de los insectos de esta subfamilia puede ser de tipo monófago o polífago, y sus miembros pueden transmitir uno o más tipos de fitoplasmas, por lo que no es raro que la mayoría de los vectores descritos pertenezcan a este grupo taxonómico.

Una de las características de estos insectos, conocidos como “langostinos”, es su capacidad de alimentarse del floema a través de su aparato bucal picador-chupador, por el cual adquieren e inoculan los fitoplasmas durante su alimentación en el floema de plantas infectadas a sanas, respectivamente. La relación trófica con las plantas, a la cuales los individuos pueden transmitir los fitoplasmas, puede ser:

- Obligada: cuando la supervivencia del insecto vector es totalmente dependiente de la especie vegetal. Ej. *Scaphoideus titanus* Ball y la vid.
- Facultativo: cuando la especie de planta es importante, pero no estrictamente necesaria para la sobrevivencia y multiplicación del insecto vector. Ej. *Hyalesthes obsoletus* Signoret y *Convolvulus arvensis* L.
- Ocasional: cuando la planta considerada no es un huésped obligado o facultativo del insecto vector, que puede alimentarse sólo de vez en cuando sobre la misma.

Los vectores ocasionales, cuyos adultos se alimentan de diversas plantas herbáceas, arbustivas y leñosas, a veces pueden comportarse de forma impredecible, provocando una infección en plantas hasta ese momento no identificadas como hospedante de fitoplasmas (Belli *et al.*, 2010).

III.5.2. Mecanismo de transmisión. El mecanismo de transmisión que presentan los cicadélidos ocurre en tres periodos (Purcell, 1982; Weintraub y Beanland, 2006) (Fig. 1):

- Periodo de adquisición: es el tiempo necesario de alimentación del insecto para adquirir los fitoplasmas. Este periodo puede tardar desde unos pocos minutos a algunas horas; mientras más extenso sea este periodo, mayor es la probabilidad de adquisición.

- Periodo latente o periodo de incubación: tiempo que transcurre entre la adquisición y la inoculación del fitoplasma. La duración de este periodo depende de la temperatura y de la relación entre el vector y el patógeno, y puede durar hasta 80 días. Durante este periodo, el fitoplasma infecta el tracto digestivo, y a través de la hemolinfa llega a las glándulas salivales del insecto (Fig. 2). En todo este tiempo, el insecto es incapaz de transmitir el fitoplasma.
- Periodo de inoculación: lapso de tiempo en el cual los insectos inoculan el patógeno a la planta sana y su duración es similar al período de adquisición.

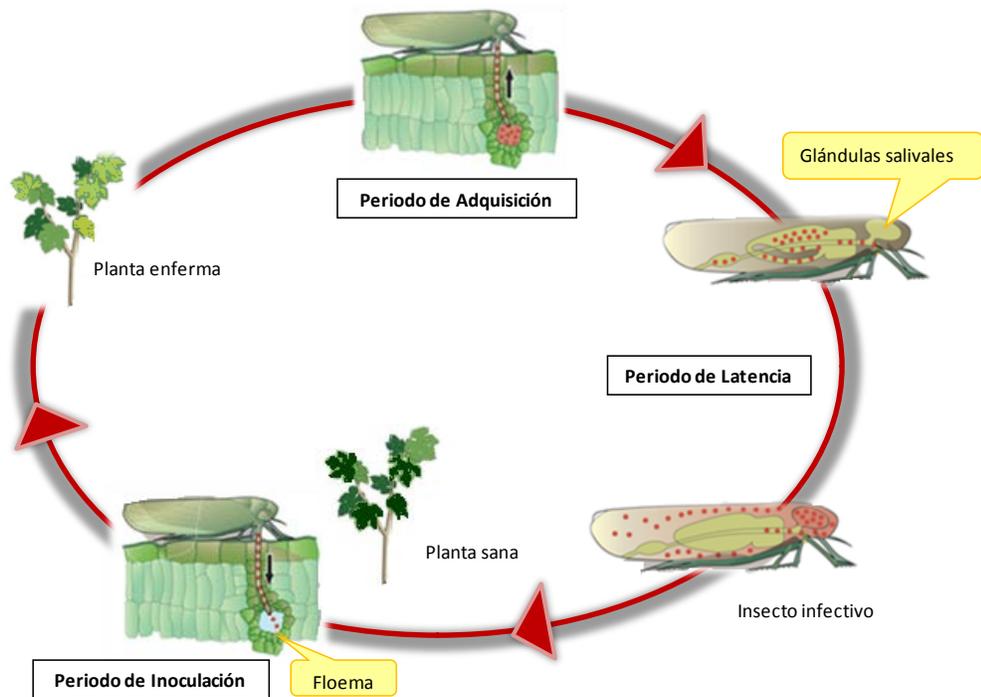


Figura 1. Proceso de adquisición e inoculación de fitoplasmas.

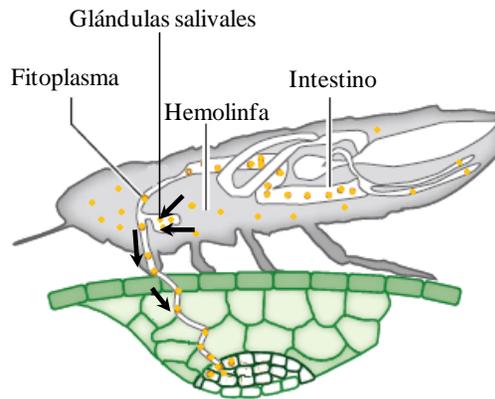


Figura 2. Multiplicación de fitoplasmas dentro del insecto. Tomado de Sugio *et al.* (2011).

Cabe destacar que una vez que los insectos adquieren los fitoplasmas, éstos pueden transmitirlos por el resto de su vida, representando una amenaza constante para los cultivos de interés económico. También se ha indicado la posibilidad de transmisión transovárica (Alma *et al.*, 1997).

III.6. Relación fitoplasma-insecto

La relación fitoplasma - insecto puede ser beneficiosa, perjudicial o neutra para ambos. Esto depende de la cepa de fitoplasma, la especie del vector y las condiciones ambientales (Weintraub y Beanland, 2006). Ello implica que algunos fitoplasmas pueden afectar a sus insectos vectores, provocando una reducción significativa en la sobrevivencia de los adultos y la fecundidad de los huevos (Madden y Nault, 1983; Bressan *et al.*, 2005a, b). Por otro lado, también hay insectos que son favorecidos por la infección de estos patógenos, en tal grado que dichos vectores pueden sobrevivir más tiempo y producir más individuos en la progenie que aquellos insectos no infectados (Purcell, 1988; Garcia-Salazar *et al.*, 1991; Murrall *et al.*, 1996; Beanland *et al.*, 2000).

IV. Importancia de las enfermedades causadas por fitoplasmas en la vid

La enfermedad más dañina causada por fitoplasmas que afecta a la vid es la “Flavescencia dorada - “FD” (16SrV-C y D). Se encuentra distribuida en algunas regiones de Europa y es transmitida por un vector específico, el cicadélido ampelófago *S. titanus* Ball (Conti, 2001). Cuando no se realiza el control del vector, el número de viñedos infectados puede aumentar del 10% en el año, hasta llegar al 80 - 100% en pocos

años. En Francia, ha destruido grandes aéreas vitivinícolas a pesar del control estricto del insecto y la eliminación de plantas enfermas (Steffek *et al.*, 2007). Otra fitoplasmosis de importancia es la madera negra o “Bois noir” perteneciente al subgrupo ribosomal 16SrXII-A (stolbur group), cuyo vector más común es el Cixide no ampelófago *Hyalesthes obsoletus* Signoret. Su importancia se debe a que este insecto es polífago (Conti, 2001).

En muchos países con problemas de fitoplasmas en vid se han realizado trabajos de investigación para definir cuáles son los langostinos involucrados en la transmisión y cuáles son las plantas reservorios asociadas al cultivo (Boudon-Padieu, 2003). El temor a brotes epidémicos ha impulsado hacia la obtención de informaciones que permitan reducir la dispersión de los fitoplasmas a través del control de los vectores específicos (Beanland and Wolf, 2003). Estos estudios han puesto en evidencia que la transmisión de fitoplasmas por insectos ha sido rápida y eficiente, apareciendo síntomas después de un año de la inoculación, a diferencia de los cinco años que demora si la infección proviene de material de propagación (Braccini *et al.*, 1999).

V. Situación de los fitoplasmas en vid en Chile

En Chile, se han realizado estudios sobre fitoplasmas en vid (Cuadro 1). Entre los años 2002 y 2006, se realizó una prospección en viñedos en las regiones de Coquimbo, Valparaíso, Libertador General Bernardo O’Higgins, Maule y Metropolitana, donde se concentra la principal producción de vid. Se identificaron los fitoplasmas pertenecientes a los subgrupos ribosomales 16SrI-B, 16SrI-C (*Candidatus* Phytoplasma asteris’), 16SrVII-A (*Ca. P. fraxini*) y 16SrXII-A (stolbur group). El fitoplasma 16SrVII-A, se informó por primera vez en el mundo en vides chilenas. Es importante resaltar que no se detectó la presencia de la flavescencia dorada (Fiore *et al.*, 2007; Gajardo *et al.*, 2009). Además, González *et al.* (2010) identificaron por primera vez los fitoplasmas 16SrV-A (*Ca. P. ulmi*) y 16SrIII-J (X-disease group) en la vid en Chile. Preocupa la presencia del fitoplasma responsable del madera negra o “bois noir” (subgrupo 16SrXII-A), porque es responsable de una enfermedad cuyo agente se ha descrito como fácilmente transmisible por vectores, lo que le confiere capacidad de infección de tipo epidémico.

Cuadro 1. Fitoplasmas detectados en vid en Chile.

Fitoplasmas	Subgrupo ribosomal
' <i>Ca. Phytoplasma asteris</i> ' 16SrI (grupo Aster yellows)	16SrI-B 16SrI-C
' <i>Ca. Phytoplasma fraxini</i> ' 16SrVII (grupo Ash yellows)	16SrVII-A
Bois Noir (Madera negra) 16SrXII (grupo Stolbur)	16SrXII-A
' <i>Ca. Phytoplasma ulmi</i> ' 16SrV (grupo Elm yellows)	16SrV-A
16SrIII (grupo X-disease)	16SrIII-J

En cuanto a los insectos vectores en Chile, asociados a viñedos infectados por fitoplasmas, se han capturado e identificado individuos pertenecientes a diferentes especies del suborden Auchenorrhyncha. Se ha detectado la presencia de fitoplasmas en insectos de las subfamilias Delthocephalinae y Agalliinae (familia Cicadellidae) y de las familias Cixiidae y Delphacidae, todos ellos conocidos como potenciales vectores de fitoplasmas. Los análisis realizados indican que varios individuos resultaron positivos a fitoplasmas; en particular, en *Amplicephalus curtulus* (Linnavuori y De Long) se detectaron los fitoplasmas pertenecientes a los subgrupos 16SrI-B, 16SrIII-J y 16SrXII-A. *Paratanus exitiosus* (Beamer) resultó positivo a los fitoplasmas de los subgrupos 16SrI-B, 16SrVII-A, 16SrXII-A, 16SrIII-J y en *Bergalia valdiviana* (Berg.) se detectó el fitoplasma 16SrXII-A. Sin embargo, se desconoce cuan abundantes son de estas especies de auquenorrincos en los viñedos. En malezas recolectadas en viñedos, los fitoplasmas pertenecientes a los subgrupos 16SrI-B y 16SrVII-A fueron encontrados en *Convolvulus arvensis* L. (Correhuela) y *Polygonum aviculare* L. (Sanguinaria) y el subgrupo 16SrXII-A en *C. arvensis* y el subgrupo 16SrVII-A en *Galega officinalis* L. (Galega). En tres viñedos (Cuadro 2), las muestras de vides, malezas e insectos recogidos en el mismo viñedo fueron positivas para el mismo fitoplasma (González *et al.*, 2008; Arismandi *et al.*, 2011 b; Longone *et al.*, 2011).

Cuadro 2. Fitoplasmas detectados en vides, malezas e insectos en tres viñedos.

Variedad de vid		Fitoplasmas detectados	
Región	Vid	Malezas	Langostinos
Petit Syrah (RM)	16SrI-C	16SrI-B (<i>P. aviculare</i>)	16SrI-B (<i>P. exitiosus</i>)
	16SrI-B	16SrVII-A (<i>P. aviculare</i> , <i>C. arvensis</i>)	16SrVII-A (<i>P. exitiosus</i>)
Carménère (RM)	16SrVII-A	16SrVII-A	16SrVII-A
	16SrXII-A	(<i>C. arvensis</i>)	(<i>P. exitiosus</i>)
Pinot noir (RV)	16SrXII-A	16SrXII-A	16SrXII-A (<i>A. curtulus</i>)
	16SrVII-A	(<i>C. arvensis</i>)	16SrVII-A (<i>P. exitiosus</i>)

Las plantas que se encuentran asociadas al viñedo, sobre todo las malezas, pueden ser reservorio de fitoplasmas y, en el caso de presencia de langostinos polífagos, el peligro de transmitir estos patógenos a la vid aumenta considerablemente.

VI. Medidas de control de fitoplasmas

Las medidas de control para fitoplasmas se basan exclusivamente en la prevención de la infección. El uso de material de propagación sano es el primer paso a cumplir para evitar problemas en los futuros viñedos a implantar. Esto debe ser acompañado de un control constante de los insectos vectores, sobre todo aquellos que son polífagos. También es necesario eliminar posibles fuentes de inóculo, presentes en viñedos en producción o en su cercanía, tales como aquellas plantas que manifiestan síntomas y los huéspedes secundarios de estos patógenos, como las malezas (Bertaccini y Duduk, 2009).

Con los antecedentes que existen es necesario realizar ensayos de transmisión que permitan establecer con exactitud cuáles son los langostinos vectores de fitoplasmas asociados a los viñedos chilenos. El estudio epidemiológico de las enfermedades causadas por estos patógenos permitirá optimizar el control de los mismos fitoplasmas.

MATERIALES Y MÉTODOS

I. Muestreo

La colecta de insectos se realizó en tres viñedos localizados en tres comunas: Buin y Pirque (Región Metropolitana) y Casablanca (Región de Valparaíso). Se visitaron mensualmente, desde enero hasta mayo de 2011 (excepto febrero) con el fin de determinar la abundancia relativa de especies de auquenorrincos; posteriormente se retomó la captura de insectos de septiembre de 2011 hasta mayo de 2012 (nueve meses) para realizar las pruebas de transmisión de las dos especies más abundantes. La elección de los viñedos (Cuadro 3) se realizó en base a antecedentes que indicaban presencia de plantas infectadas por fitoplasmas. En la figura 3, se observan plantas con síntomas típicos de fitoplasmas encontradas en los tres viñedos visitados (los síntomas se describen en III.4.1).

Cuadro 3. Viñedos muestreados

Ubicación de los viñedos	Sistema de conducción	Variedad
Buin	Parronal	Petit syrah
Pirque	Espaldera	Carménère
Casablanca	Espaldera	Pinot noir

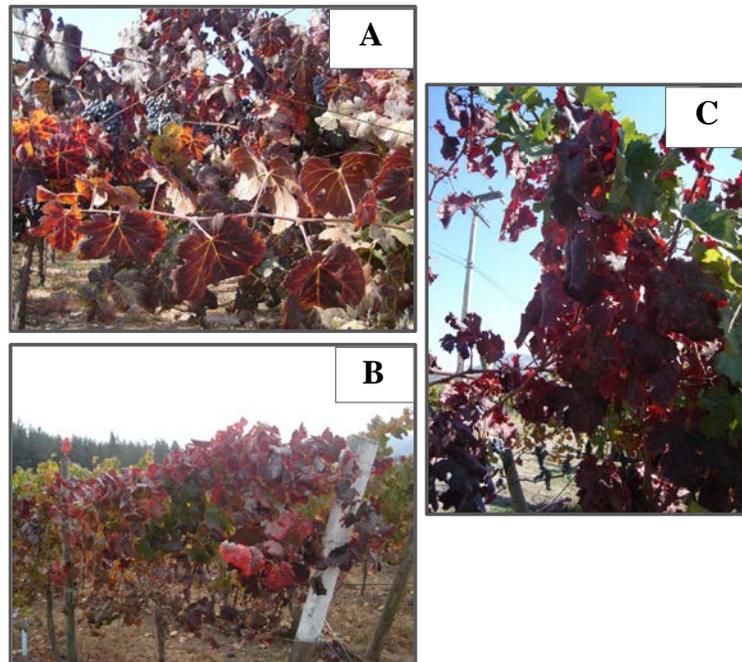


Figura 3. Síntomas de fitoplasmas en los viñedos muestreados. En Buin A) Var. Petit Syrah, Pirque B) Var. Carménère y en Casablanca C) Var. Pinot noir.

La captura de insectos se efectuó con red entomológica, desde plantas de vides y de malezas que se encontraban en el interfilas en los viñedos mencionados. Doscientas redadas se realizaron por viñedo todas las veces: 100 en vides y 100 en malezas. Posteriormente, los insectos se colocaron en tubos de ensayos con tapón de algodón y una ramita de maleza para que los insectos se alimenten hasta su colocación en las jaulas para las pruebas de transmisión. Cada tubo se identificó con un código. La cantidad de insectos que se recolectaron por viñedo y en cada salida fue de aproximadamente 76 individuos (Fig. 4), y éstos se llevaron refrigerados hasta el laboratorio.



Figura 4. Tubos de ensayo con los insectos recolectados en campo.

II. Actividades en laboratorio e invernadero

El trabajo experimental se realizó en la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile. La identificación de insectos y análisis moleculares se efectuó en el laboratorio de Fitovirología del Departamento de Sanidad Vegetal y las pruebas de transmisión se realizaron en un invernadero de la misma Facultad.

II.1. Caracterización taxonómica de especies y su abundancia relativa

Los insectos capturados cada mes durante los trece meses que se llevó a cabo este estudio, fueron observados utilizando una lupa binocular LEICA S6D. Estos se separaron según característica morfológicas (color, dibujo de la zona dorsal, tamaño) (Anexo II). La identificación de los insectos auquenorrincos capturados se realizó mediante la comparación con fotografías tomadas anteriormente por el Dr. Alberto Alma de la Universidad de Turín, Italia.

Para conocer las dos especies de insectos auquenorrincos más abundantes se utilizó el índice de abundancia Relativa (AR). Este índice se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación: $AR = (n_i/n_t)$, donde “ n_i ” representa el número de individuos de la especie “ i ” y “ n_t ” el número total de individuos capturados durante los primeros 4 meses de estudio (enero a mayo de 2011, excepto febrero), considerando todas las especies en cada muestreo. Las dos especies más abundantes se utilizaron para realizar las pruebas de transmisión. También, se evaluó la abundancia relativa de las dos especies de insectos más frecuentes, capturados durante los nueve meses de duración de las pruebas de transmisión.

II.2. Pruebas de transmisión con cicadélidos

II.2.1. Obtención de plantas. Para realizar los ensayos de transmisión, se utilizaron plantas de *Catharanthus roseus* L. (vinca) y vid de la variedad Cabernet Sauvignon obtenidas a partir de semillas. Se realizaron análisis moleculares de nested-PCR tanto a las semillas como a las plantas después de germinadas para confirmar que estuvieran libres de fitoplasmas. El número total de plantas que se utilizaron para realizar la transmisión en cada viñedo durante los nueve meses de muestreo (septiembre de 2011 hasta mayo de 2012), se detalla en la Cuadro 4.

Cuadro 4. Número total de plantas utilizadas en las pruebas de transmisión.

Especies de plantas	N° total de plantas usadas en transmisión ^a			Total de plantas ^a
	Buin	Pirque	Casablanca	
Vinca	30	30	36	96
Vid	30	42	45	117

a/ Plantas de vinca y vid que estuvieron en contacto con los insectos.

La diferencia en la cantidad de plantas utilizadas para las pruebas de transmisión entre los tres viñedos, se debe a que durante los nueve meses de captura no siempre se encontraron los cicadélidos de interés (Anexo III) (ver en resultados: II. Pruebas de transmisión).

La obtención de plantas de vincas se realizó en almácigo, trasplantándose las plantas cuando éstas tenían cuatro hojas verdaderas, disponiéndose en recipientes plásticos (250cc). En el caso de las semillas de vid, éstas se sembraron en tubos plásticos (300cm³) y luego las plántulas se trasplantaron a bolsas plásticas negras (8 x 20 cm). El sustrato utilizado fue el mismo para las dos especies vegetales. Estuvo constituido por: 1 parte de arena, 1 parte de tierra agrícola, 3 partes de tierra de hoja, 3 partes de turba y 2 partes de perlita. La mezcla del sustrato se realizó con una mezcladora de cemento, luego se esterilizó en autoclave de vapor a 1,5 kgf/cm² de presión por 30 minutos, para eliminar la presencia de patógenos que podían afectar el desarrollo de las plantas. Para los ensayos de transmisión se utilizaron plantas herbáceas de 5 a 8 cm de altura (Fig. 5).

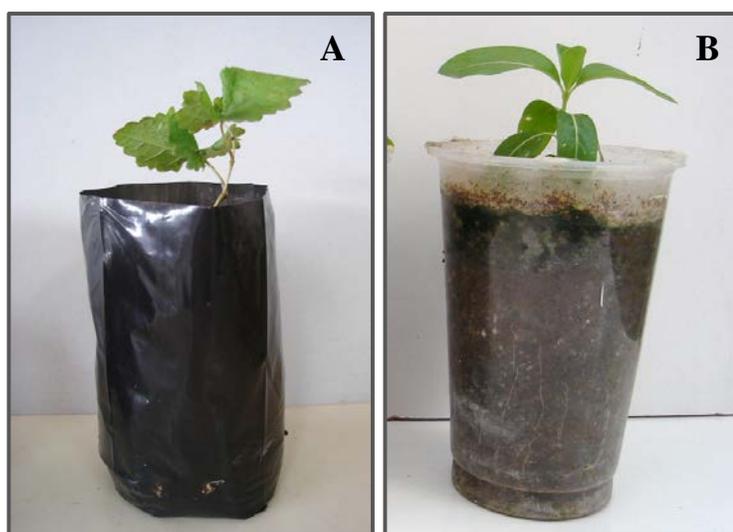


Figura 5. Plantas utilizadas para la transmisión: A) vid cv. Cabernet Sauvignon y B) *Catharanthus roseus* L. (vinca).

II.2.2. Armado de jaulas. Se armaron 12 estructuras en total (50cm x 40cm x 50cm), utilizando malla antiáfido para evitar la fuga de los insectos. De cada estructura se obtuvieron dos jaulas, colocando una malla antiáfido en el medio (Fig. 6).



Figura 6. Armado de jaulas para las pruebas de transmisión.

II.2.3. Ensayos de transmisión. Se realizaron de la siguiente manera: los individuos de cada especie de insecto se dividieron en dos grupos iguales; un grupo se colocó en la jaula con 3 plantas de vinca y el otro grupo en otra jaula con 3 plantas de vid. Hay que señalar, que para cada viñedo y en cada salida mensual, se usaron jaulas y plantas distintas. Se dejaron 3 plantas de vid y 3 de vinca libres de insectos por viñedo como control. Todas las plantas fueron identificadas con un código. Éstas se mantuvieron bajo condiciones de invernadero a 23°C con 16 h de luz y 8 h de oscuridad (Fig. 7).



Figura 7. Jaulas con plantas en transmisión en invernadero.

A medida que los insectos morían, se retiraron inmediatamente de las jaulas y se colocaron en microtubos con alcohol al 70%. A dichos microtubos se les identificó con el código correspondiente al ensayo de transmisión respectivo, manteniéndose a 4°C hasta su análisis molecular.

Una vez que todos los insectos fueron retirados de las jaulas, las plantas también se sacaron y se trataron periódicamente con insecticidas para evitar la presencia de generaciones descendientes. Se mantuvieron en invernadero a la espera de manifestación de síntomas. Las plantas de vinca se analizaron molecularmente después de tres meses del inicio de la prueba de transmisión y las plantas de vides, en marzo de 2013.

II.3. Caracterización molecular de fitoplasmas en vides, vincas y langostinos

II.3.1. Extracción de ADN total. La extracción de ADN se realizó mediante el protocolo modificado propuesto por Zhang *et al.* (1998), el cual se describe a continuación para plantas y langostinos.

• **Plantas** La extracción de ADN de las plantas se realizó desde nervaduras. En un mortero estéril, se colocó 1 g de tejido y se molió con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. Posteriormente, se adicionó 8 mL de Grinding buffer (100 mM de K_2HPO_4 , 30 mM de KH_2PO_4 , 10% de sacarosa, 2% de PVP, 0,15 % de BSA fracción V y 30 mM de ácido ascórbico) y se transfirió a un tubo de 15 mL. El macerado se centrifugó por 30 minutos a 12000 g a 4°C y el sobrenadante se eliminó. Al precipitado se le agregó 4 mL de buffer de extracción (0,1 M de Tris – HCl 1M pH 8.0, 50mM de EDTA 0,5M pH 8.0 y 0,5 M de NaCl), 80 mL de proteinasa K (5mg/mL) y 440 μ L de N lauryl-saucosil al 10 %, mezclándose por inversión. Luego los tubos se incubaron a 55°C por 120 minutos, terminada la incubación se centrifugó por 10 minutos a 7500g a 4°C. El sobrenadante se transfirió a un tubo que contenía 2,5 mL de isopropanol (0,6 v/v) y se dejó incubar a -20°C por 30 minutos. Luego se centrifugó por 15 minutos a 7500g a 4°C y se eliminó el sobrenadante. El precipitado se resuspendió con 3 mL de buffer TE 1X (10 mM de Tris - HCl 1M pH 8.0 y 1 mM de EDTA 0,5M pH 8.0), 60 μ L de proteinasa K (5mg/ml) y 75 μ L de SDS al 20 % y se mezcló por inversión e incubó a 37°C por 1 hora. Tras la incubación, se añadió 525 μ l de NaCl 5M y 420 μ l de CTAB/ NaCl (CTAB al 10% y 0,7M de NaCl), nuevamente se mezcló e incubó a 65°C por 10 minutos. Una vez concluida la incubación, se agregó 2 mL de cloroformo: alcohol isoamilico 24:1 y 2 mL de fenol saturado en TE 1X pH8, se agitó vigorosamente y se centrifugó por 10 minutos a 6500g a 4°C. La fase superior se transfirió a un tubo con 2,5 mL isopropanol (0,6 v/v), se mezcló por inversión y se dejó a 4°C toda la noche.

Al día siguiente, se centrifugó por 30 minutos a 12000g a 4°C y se descartó el sobrenadante con cuidado. El precipitado de ADN fue lavado con 1 mL de etanol al 70% frío. Posteriormente se centrifugó 10 minutos a 12000g a 4°C y se eliminó el sobrenadante. Los tubos se dejaron secar hasta evaporarse todo el alcohol etílico. Finalmente, el ADN se resuspendió en 50 a 200 μ L de buffer TE 1X pH8.0 y se traspasó a tubos de 0,5 ml, guardándose a 4°C las muestras. El ADN se cuantificó con espectrofotómetro.

• **Langostinos** Para la extracción de ADN se agruparon máximo 5 insectos de una misma especie, todos procedentes de un mismo ensayo de transmisión.

Los langostinos se colocaron en tubos de 1,5 mL, se molieron con el uso de pistilos estériles y con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. Luego se agregó 200 µL de buffer de extracción (3 % de CTAB, 0,2 % de 2-β mercaptoetanol, 1,4 M de NaCl, 10 mM de EDTA 0,5 M pH 8.0 y 0,1M Tris-HCl 1M pH 8.0) y se incubó por 30 minutos a 65°C. Posteriormente, se agregó 200 µL de cloroformo: alcohol isoamílico 24:1 y se agitó vigorosamente. Los tubos se centrifugaron durante 10 minutos a 11000 rpm a 4°C. El sobrenadante se transfirió a un tubo con 200 µL de isopropanol, se mezcló y se llevó a incubación por 5 minutos a -20°C. Luego de 15 minutos de centrifugación a 11000rpm a 4°C se eliminó el sobrenadante. Se agregó 100 µL de solución de NaCl 1,2M y 100 µL de solución de cloroformo/alcohol isoamílico 24:1 y se mezcló vigorosamente. Se centrifugó los tubos a 11000 rpm por 10 minutos a 4°C. Se transfirió el sobrenadante a un set de tubos y se les adicionó 100 µL de isopropanol frío mezclándose vigorosamente para luego centrifugar los tubos a 11000 rpm por 10 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se lavó el precipitado de ADN con 100 µL de solución de alcohol etílico 70% frío. Se centrifugó a 11000 rpm por 5 minutos a 4°C y se eliminó el sobrenadante. Los tubos se dejaron secar hasta evaporarse todo el alcohol etílico. Finalmente, se resuspendió el precipitado de ADN con 40 a 60µL de buffer TE 1X pH 8.0, y se traspasó a tubos de 0,6 mL, guardándose a -20°C las muestras.

II.3.2. Detección de fitoplasmas por nested-PCR. Para la detección de los fitoplasmas en plantas e insectos se utilizó la técnica definida “nested”- PCR (PCR anidada), que consiste en un primer PCR con partidores universales, cuyo producto de amplificación se somete a un segundo PCR con otra pareja de partidores universales, para aumentar la sensibilidad de la técnica (Gundersen y Lee, 1996). Los partidores utilizados en este estudio amplifican regiones del genoma de las fitoplasma correspondientes a dos genes.

• **Gen *tuf*.** Los PCR para la amplificación del gen *tuf* se llevaron a cabo según el protocolo de Makarova *et al.* (2012). En este caso, para la detección de fitoplasmas, se utilizó en el PCR directo, un coctel de partidores Tuf340/Tuf890 que amplifica 550 pb. La dilución 1:30 del producto de amplificación del PCR anterior se utilizó en el nested-PCR, realizado con otro coctel de partidores Tuf400/Tuf835 que amplifican 438 pb (Cuadro 5).

Cuadro 5. Partidores para la detección del gen *tuf* propuestos por Makarova *et al.* (2012).

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

Cada PCR se realizó utilizando un volumen final de 30 μ L que contenía los siguientes componentes: 2,5 μ L de ADN extraído (20 ng/ μ L), 1 μ L de cada partidor según corresponda (10 μ M) (Cuadro 5), 3 μ L de buffer PCR (10X), 0,9 μ L de MgCl₂ (25 mM), 0,6 μ L de dNTP's (10 mM), 21 μ L de agua bidestilada y 0,15 μ L de enzima Taq polimerasa Platinum (Invitrogen).

Estas reacciones se llevaron a cabo en un termociclador (Techne TC 3000 6) con incubación de 3 minutos a 94°C, seguido de 35 ciclos que consistía en las siguientes etapas: desnaturalización de 15 segundos a 94°C; apareamiento de partidores por 30 segundos a 54°C; elongación de 1 minuto a 72°C. La extensión final fue de 72°C durante 7 minutos seguida por una reducción de la temperatura a 4°C por un tiempo indefinido para enfriamiento y conservación de las moléculas de ADN sintetizadas. En ambas reacciones de PCR se utilizó el mismo procedimiento.

. **Gen 16S rDNA.** La amplificación del gen 16S rDNA se realizó a través de PCR según el protocolo de Schaff *et al.* (1992). En la detección de fitoplasmas, se utilizaron en el PCR directo los partidores universales P1/P7 que amplifican 1819 pb. Luego, se realizó el nested-PCR, previo dilución de 1:30 del producto de amplificación del PCR anterior; para el nested-PCR se usaron los partidores universales R16F2n/R2 que amplifican 1250 pb (Cuadro 6).

Cuadro 6. Partidores universales para la detección de gen 16S rDNA.

Partidores	Secuencia partidores (5' - 3')	Cita bibliográfica
P1	AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT	Deng and Hiruki, 1991
P7	CGTCCTTCATCGGCTCTT	Smart <i>et al.</i> , 1996
R16F2n	GAAACGACTGCTAAGACTGG	Gundersen and Lee, 1996
R16R2	TGACGGGCGGTGTGTACAAACCCCG	Gundersen and Lee, 1996

Cada reacción de PCR se realizó utilizando un volumen final de 26 μL que contuvo los siguientes componentes: 2 μL de ADN extraído (20 $\text{ng}/\mu\text{L}$), 0,4 μL de cada partidor según correspondía ($\text{nmol}/\mu\text{L}$), 2,5 μL de buffer PCR (10X), 0,75 μL de MgCl_2 (50 μM), 0,5 μL de dNTP's (10 μM), 19,2 μL de agua bidestilada y 0,25 μL de enzima Taq polimerasa Platinum (Invitrogen). Estas reacciones se llevaron a cabo en un termociclador (Techne TC 3000 6) con incubación de 1 minuto a 94°C, seguida de 35 ciclos que consistió en las siguientes etapas: desnaturalización de 1 minuto a 94°C; apareamiento de los partidores por 45 segundos a 53°C (55°C desde el segundo ciclo); elongación de 90 segundos a 72°C. La extensión final fue de 72°C durante 7 minutos seguida por una reducción de la temperatura a 4°C por un tiempo indefinido para enfriamiento y conservación de las moléculas de ADN sintetizadas.

Para la reacción del nested-PCR se utilizó el mismo procedimiento que la primera reacción, solo modificando la temperatura de apareamiento de los partidores, utilizando 55°C.

En todas las reacción de PCR que se realizó para el gen *tuf* y 16S rDNA, se utilizó como control positivo extracto de ADN de fitoplasma del subgrupo ribosomal 16SrI-F (Ash yellows, A-AY) mantenido en vinca *in vitro* en la colección del laboratorio de Fitovirología, Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile. Como control negativo se utilizaron las plantas que no estuvieron en contacto con los insectos.

Electroforesis. Los productos de amplificación procedentes de los nested-PCR para ambos genes estudiados, se analizaron a través de electroforesis, en gel de agarosa 1,2% utilizando buffer TAE 1X (Tris 40 mM, 20 mM de ácido acético y EDTA 1 mM, pH 8,0). Los geles se tiñeron con bromuro de etidio. La electroforesis se realizó utilizando una fuente de poder (EPS – 300 IIV) a 110 voltios durante 30 minutos. Los productos de amplificación se visualizaron a través de un transiluminador de luz UV y se fotografiaron utilizando el equipo de fotodocumentación de luz UV. Para la determinación del tamaño de los fragmentos amplificados se utilizó 6 μL de ADN ladder 100 bps (Invitrogen).

Las bandas de ADN positivas amplificadas en los nested-PCR se cortaron del gel de agarosa para su purificación siguiendo el protocolo comercial E.Z.N.A Kit (Omega Biotek).

II.3.3. Clonamiento

a) Ligación de los productos de PCR en el vector de clonación. Los fragmentos de 1.250 pb y 420 pb de fitoplasmas amplificados por nested-PCR y posteriormente purificados, fueron ligados en el vector de clonación pGEM-T Easy Vector System I (Promega).

La reacción de ligación fue realizada de la siguiente manera: se mezclaron 3 μ L de ADN purificado, 1 μ L del vector (25ng/ μ L), 5 μ L de buffer de clonación (2X) y 1 μ L de T4 DNA ligasa (3U/ μ L), en un volumen total de reacción de 10 μ L. Posteriormente, la reacción se incubó a 4°C durante toda la noche. Después de este proceso, el producto de la ligación estuvo listo para ser transferido a las células competentes de la bacteria *Escherichia coli*.

b) Transformación de las células competentes. A continuación se realizó el proceso de transformación, a través del cual el vector que contiene el fragmento de ADN se inserta en las células competentes de *E. coli* Top 10[®] (Invitrogen).

En un microtubo de 1,5 mL se colocaron de 10 μ L de la reacción de ligación y 100 μ L de células competentes; todo se mantuvo en hielo por 10 minutos. Luego se procedió al choque térmico, por incubación a 42°C por 2 minutos. Se volvieron a colocar los microtubos en hielo por 2 minutos. Luego, se agregaron 400 μ L de medio líquido de LB (1% de triptona, 0,5 % de extracto de levadura, 0,25 % de NaCl) a los microtubos que contenían las células transformadas. Los microtubos se incubaron a 37°C por 1 hora en agitación para promover el crecimiento de las células transformadas. Posteriormente, se centrifugaron los microtubos a 3000 rpm por 2 minutos para obtener un concentrado de células y se descartó aproximadamente 450 μ L del sobrenadante. Luego, se resuspendió el “pellet” en el resto del sobrenadante (aproximadamente 50 μ L). Bajo campana de flujo laminar, se sembraron 20 μ L de la reacción de transformación en placas Petri con medio LB 4% de agar, carbenicilina (100mg/mL), IPTG (100mg/mL) (isopropinil- β -D tiogalactopiranosida) y X-Gal (20ng/mL) (5-bromo-4-cloro-3indol- β -D galactopiranosida) y se incubaron por 16 horas a 37°C. Al final del periodo de incubación fue posible diferenciar entre las células transformadas de aquellas no transformadas, a través de la coloración que presentan las colonias. Las células transformadas presentaron colonias de color blanco. Esto sucede cuando las colonias recombinantes han incorporado el plasmidio con el fragmento de ADN: la inserción interrumpe el marco de lectura de la β -galactosidasa haciéndola no funcional. Por lo tanto es incapaz de emplear el sustrato X-Gal para producir la coloración azul que aparece en las colonias formadas a partir de una célula no transformadas.

Para confirmar la presencia del inserto, se realizó un PCR utilizando la pareja de partidores SP6/T7 que flanquean la zona de inserto en el plasmidio. Los productos de amplificación obtenidos por PCR se purifican desde gel de agarosa siguiendo el protocolo comercial E.Z.N.A Kit (Omega Biotek).

II.3.4. Obtención de secuencias. Una vez purificado el ADN clonado de los genes *tuf* y 16S rDNA, estos se enviaron a Magrogen Corp (USA) cinco clones de cada aislado para su secuenciación.

II.3.5. Identificación molecular. Las secuencias se editaron y alinearon utilizando los programas BioEdit and CLUSTAL X2 (Thompson *et al.*, 1997; Hall, 1999); para comparar las secuencias nucleotídicas obtenidas con aquellas de fitoplasmas publicadas en el *National Center for Biotechnology Information (NCBI)* disponible en internet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>).

Para completar la identificación se recurrió al análisis del polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) *in silico*. Las secuencias nucleotídicas correspondientes a los genes *tuf* y 16S rDNA de los fitoplasmas encontrados durante este estudio, tanto en plantas de vid y vinca como en insectos, fueron alineadas con referencia depositadas en Genbank y Q-Bank. A través del programa Vector NTI Suite 7.1 se realizó una digestión virtual con enzimas propuestas por Wei *et al.* (2007). Estas enzimas fueron *MseI*, *NdeII*, *HhaI*, *BstUI* y *RsaI*, las dos primeras se utilizaron para el gen *tuf* y las tres últimas para el gen 16S rDNA. Esta digestión *in silico* generó una imagen simulada de electroforesis en gel de poliacrilamida al 6%. Esta imagen revela los perfiles correspondientes a los fitoplasmas del grupo 16SrIII.

RESULTADOS

I. Caracterización de especies y abundancia relativa

Durante cuatro meses de estudio (enero a mayo de 2011, excepto febrero) para conocer la abundancia relativa de las especies de auquenorrincos, se analizaron 12 colectas. El número total de insectos colectados fue 912 en los tres viñedos.

En los viñedos se capturaron adultos de cicadélidos, pertenecientes a la subfamilia Deltocephalinae (*P. exitiosus*, *A. curtulus* y *Amplicephalus* sp.), de la subfamilia Agalliinae (*Bergalia valdiviana* y *Bergalia* sp.) y de la subfamilia Xerophloeinae (*Xerophloea* sp.) (Anexo II). También se encontraron ninfas e individuos adultos de otras especies de cicadélidos no identificadas.

La abundancia relativa de los langostinos provenientes de Buin se observa en la figura 8. *Paratanus exitiosus* se capturó durante los 4 meses, siendo la especie más abundante en el viñedo. En cambio, *A. curtulus* se presentó de marzo a mayo siendo poco abundante.

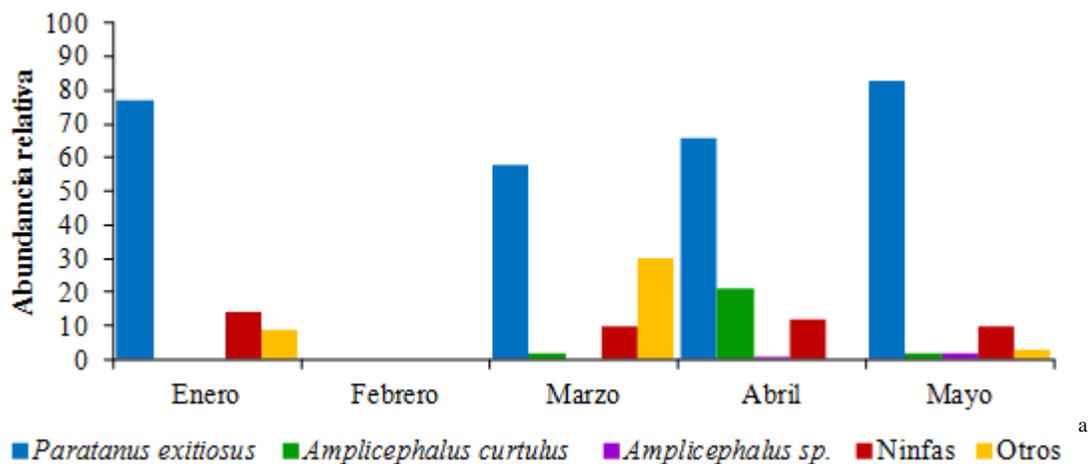


Figura 8. Abundancia relativa de los insectos colectados en el viñedo de Buin. a/ Otros: debido a la baja frecuencia de captura, se agruparon las siguientes especies: no identificadas, *Bergalia valdiviana* y *Bergalia* sp.

En Pirque, *P. exitiosus* se capturó durante los 4 meses, disminuyendo su abundancia durante los meses de coleta. Por el contrario, la abundancia relativa de *A. curtulus* fue más alta desde marzo a mayo (Fig. 9).

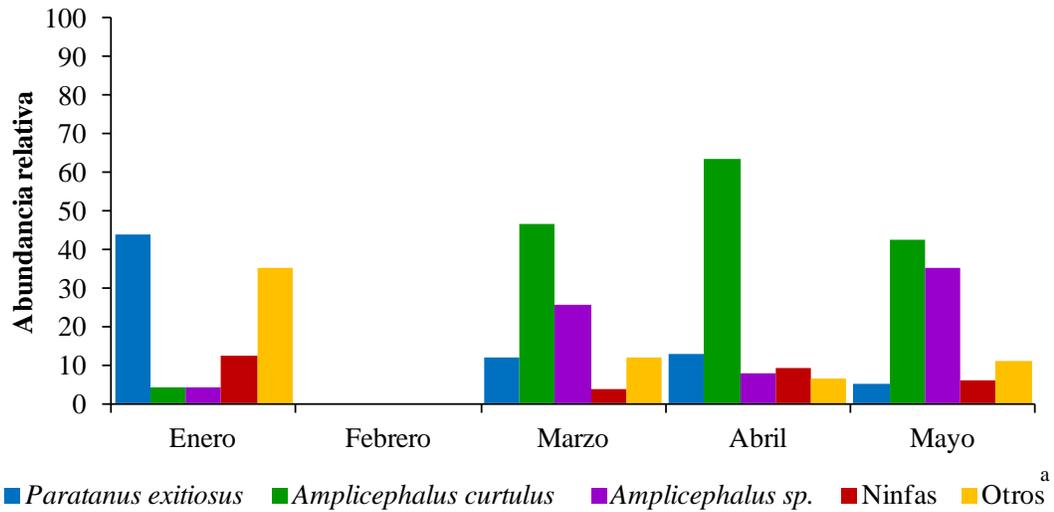


Figura 9. Abundancia relativa de los insectos colectados en el viñedo de Pirque.

a/ Otros: debido a la baja frecuencia de captura, se agruparon las siguientes especies: no identificadas, *Bergalia valdiviana* y *Bergalia sp.*

Con relación al viñedo de Casablanca (Fig.10), los cicadélidos más abundantes fueron *P. exitiosus* y *A. curtulus*, con una tendencia parecida a la que se detectó en el viñedo de Pirque. La abundancia relativa de *P. exitiosus* fue disminuyendo con el pasar de los meses, mientras *A. curtulus* aumentó su población desde marzo a mayo.

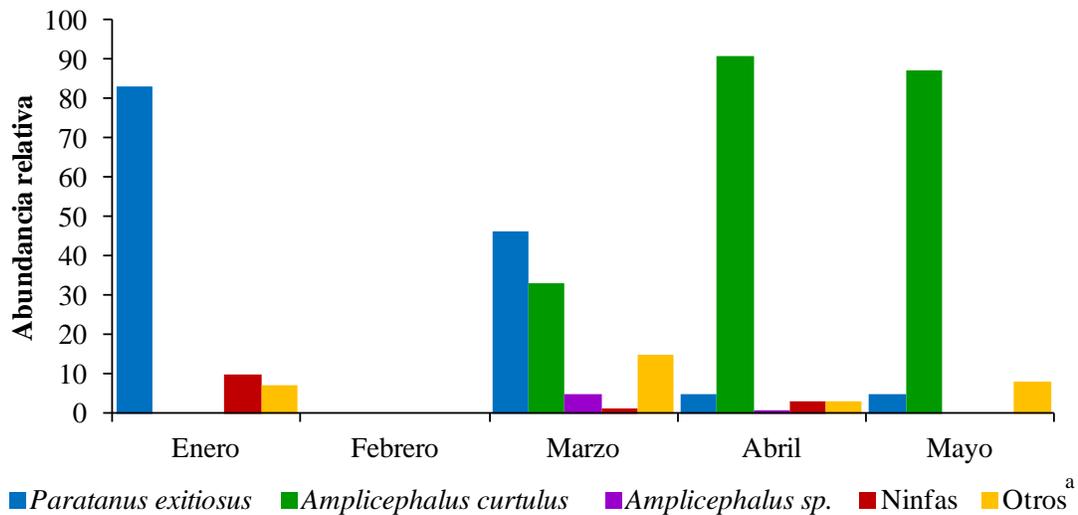


Figura 10. Abundancia relativa de los insectos colectados en el viñedo de Casablanca.

a/ Otros: debido a la baja frecuencia de captura, se agruparon las siguientes especies: no identificadas, *Bergalia valdiviana* y *Bergalia sp.*

En suma, los langostinos que se encontraron con mayor frecuencia en los tres viñedos fueron *P. exitiosus* y *A. curtulus*.

Dado que *P. exitiosus* y *A. curtulus* fueron los cicadélidos más abundantes en los tres viñedos, se tomó la decisión de realizar las pruebas de transmisión con estas dos especies de cicadélidos. En las 27 colectas de septiembre 2011 a mayo 2012, se capturó un total de 2.051 cicadélidos, procedentes de los tres viñedos. De ellos, 1.091 individuos fueron *P. exitiosus* y 228 *A. curtulus*.

El número total de *P. exitiosus* y *A. curtulus* capturados en cada viñedo para realizar las pruebas de trasmisión, se detalla en el Cuadro 7:

Cuadro 7. Número total de *P. exitiosus* y *A. curtulus* capturados en cada viñedo.

Viñedos	<i>P. exitiosus</i>	<i>A. curtulus</i>
Buín	563	21
Pirque	187	67
Casablanca	341	140
Total	1.091	228

En este periodo también se evaluó la abundancia relativa de los dos cicadélidos, con el objetivo de ver cómo se comportaban los insectos durante el ciclo vegetativo de la vid.

En la figura 11 se observa que *P. exitiosus* predominó en el viñedo de Buín. Éste presentó en el mes de abril una gran disminución de la población, debido a aplicación de herbicida. En cambio, *A. curtulus* solo se capturó en septiembre y octubre.

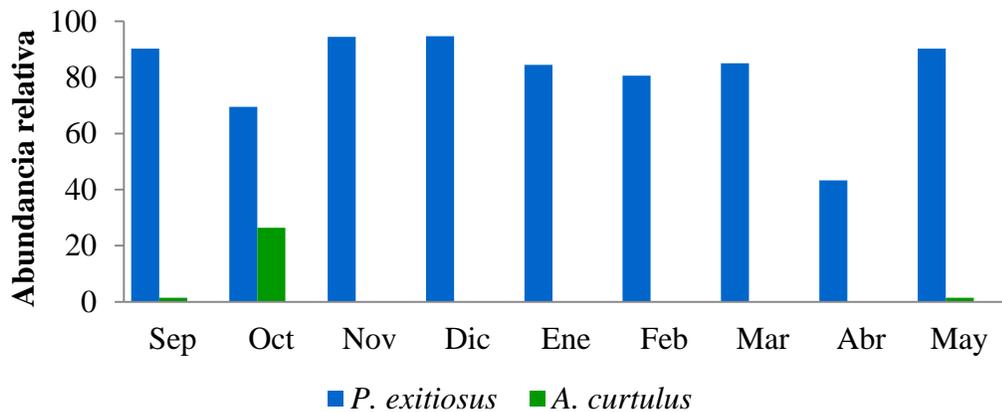


Figura 11. Abundancia relativa de *P. exitiosus* y *A. curtulus* entre septiembre de 2011 y mayo de 2012 en el viñedo de Buín.

Las dos especies más frecuentes, *A. curtulus* y *P. exitiosus*, poseen abundancias relativas diferentes a lo largo del ciclo del cultivo en Pirque (Fig. 12). *P. exitiosus* se encontró en

todos los meses de captura. Por el contrario, *A. curtulus* presenta dos picos correspondientes a septiembre-octubre y abril-mayo.

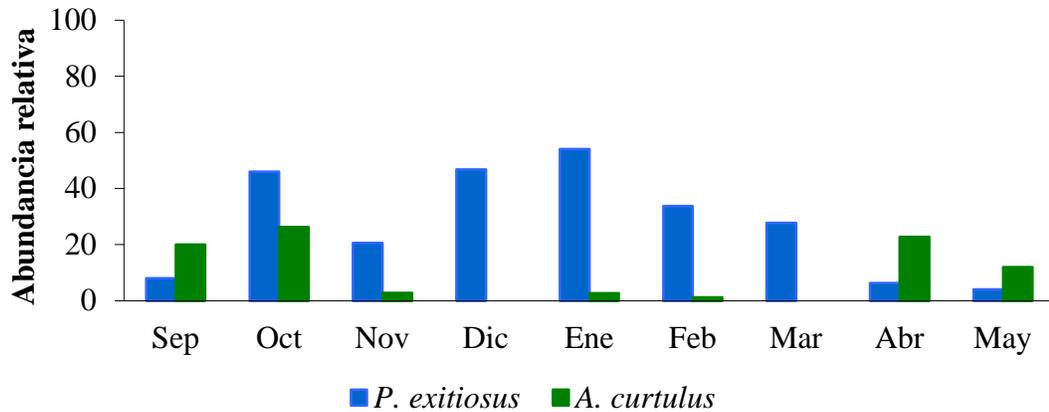


Figura 12. Abundancia relativa de *P. exitiosus* y *A. curtulus* entre septiembre de 2011 y mayo de 2012 en el viñedo de Pirque.

De los cicadélidos capturados en Casablanca (Fig. 13), *P. exitiosus* fue el más abundante y se mantuvo casi constante durante los ocho meses de colecta (con excepción del mes de septiembre). En cambio, *A. curtulus* se capturó abundantemente en septiembre, disminuyendo hasta enero (donde no hubo capturas) y reapareció a partir de marzo.

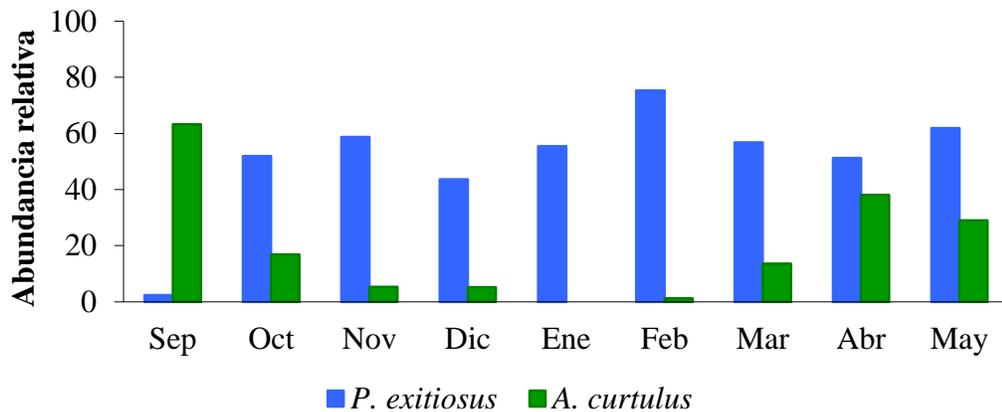


Figura 13. Abundancia relativa promedio de *P. exitiosus* y *A. curtulus* entre septiembre de 2011 y mayo de 2012 en el viñedo de Casablanca.

II. Pruebas de transmisión

Para la realización de las pruebas de transmisión se utilizaron 96 plantas de vincas y 117 plantas de vid. La cantidad de plantas utilizada para cada insecto colectado en cada viñedo se detalla en la Cuadro 8 (Anexo III).

Cuadro 8. Número total de plantas utilizadas en las pruebas de transmisión con los dos cicadélidos colectados en los tres viñedos.

Plantas	<i>P. exitiosus</i>			<i>A. curtulus</i>			Total
	Buin	Pirque	Casablanca	Buin	Pirque	Casablanca	
Vinca	27	18	24	3	12	12	96
Vid	27	27	27	3	15	18	117

El número de langostinos capturados en los tres viñedos, colocados en jaulas en contacto con plantas de vinca y vid para las pruebas de transmisión se observan en los cuadro 9, 10 y 11.

Cuadro 9. Número de langostinos capturados en Buin por jaula, colocados en contacto con plantas de vinca y vid en las pruebas de transmisión.

	<i>P. exitiosus</i>		<i>A. curtulus</i>	
	Vinca	Vid	Vinca	Vid
Septiembre	32	33	0	0*
Octubre	24	25	8	9
Noviembre	34	34	0	0
Diciembre	36	36	0	0
Enero	32	33	0	0
Febrero	31	31	0	0
Marzo	34	34	0	0
Abril	17	18	0	0
Mayo	32	33	0	0*

*/ Se capturó 2 individuo de *A. curtulus* que murieron antes de colocarlos a transmisión.

Cuadro 10. Número de langostinos capturados en Pirque por jaula, colocados en contacto con plantas de vinca y vid en las pruebas de transmisión.

	<i>P. exitiosus</i>		<i>A. curtulus</i>	
	Vinca	Vid	Vinca	Vid
Septiembre	0	6	7	8
Octubre	17	17	8	9
Noviembre	7	8	0	2
Diciembre	18	18	0	0
Enero	20	20	0	0*
Febrero	13	14	0	0*
Marzo	10	10	0	0
Abril	0	5	8	9
Mayo	0	3	4	5

*/ En estos 2 meses se capturó 2 y 1 *A. curtulus* que murieron antes de colocarlos a transmisión.

Cuadro 11. Número de langostinos capturados en Casablanca por jaula, colocados en contacto con plantas de vinca y vid en las pruebas de transmisión.

	<i>P. exitiosus</i>		<i>A. curtulus</i>	
	Vinca	Vid	Vinca	Vid
Septiembre	0	2	26	26
Octubre	19	20	6	7
Noviembre	22	22	0	4
Diciembre	8	9	0	0*
Enero	20	21	0	0
Febrero	30	30	0	0*
Marzo	24	24	0	8
Abril	21	21	16	16
Mayo	23	23	10	11

*/ En estos 2 meses se capturó 2 y 1 *A. curtulus* que murieron antes de colocarlos a transmisión.

En cuanto a la sobrevivencia de los langostinos durante las pruebas de transmisión, para *P. exitiosus* fue de hasta 9 días y para *A. curtulus* de hasta 12 días (Cuadro 12). *P. exitiosus* sobrevivió de 5-9 días en vinca y 3-4 días en plantas de vid. *A. curtulus* sobrevivió entre 4-12 días en vinca y de 3-8 días en plantas de vid.

Cuadro 12. Días de sobrevivencia de langostinos alimentándose en plantas de vinca y vid.

Plantas	Días de sobrevivencia de langostinos (Valor promedio \pm desviación estandar)					
	<i>P. exitiosus</i>			<i>A. curtulus</i>		
	Buin	Pirque	Casablanca	Buin	Pirque	Casablanca
Vinca	9 \pm 2,08	6 \pm 1,47	5 \pm 2,97	12 \pm 2,31	4 \pm 2,35	4 \pm 2,48
Vid	4 \pm 1,77	3 \pm 1,16	4 \pm 1,99	8 \pm 3,27	3 \pm 2,54	4 \pm 1,93

II.1. Síntomas de fitoplasmas en plantas de vinca y vid

En invernadero, en algunas de las plantas de vinca y vid que estuvieron en contacto con *P. exitiosus*, recolectados en los tres viñedos, se observaron síntomas causados por fitoplasmas. En cambio, en plantas de vid y vinca que se utilizaron en las pruebas de transmisión con *A. curtulus* colectados en los tres viñedos, no se desarrollaron síntomas típicos de fitoplasmas.

De 27 plantas de vincas que estuvieron en contacto con *P. exitiosus* capturados en Buin, sólo 3 (11,1%) de ellas presentaron síntomas de fitoplasmas. En las vinca 28C (Vc 28C) y vinca 31C (Vc 31C) los síntomas fueron muy notorios a diferencia de la vinca 37C (Vc 37C). La Vc 28C en noviembre de 2011, estuvo en contacto con los langostinos. Los primeros síntomas se expresaron a los dos meses después del inicio de la transmisión. Las flores mostraban síntomas de virescencia, filodia y esterilidad floral. A los tres meses, se observaron amarilleces en las hojas y las flores seguían mostrando los mismos síntomas. Posteriormente, hubo proliferación de brotes con apariencia de escoba de bruja. Finalmente sus ramas se volvieron más laxas, flexibles y frágiles, debido a un alargamiento anormal de los entrenudos, con hojas más pequeñas que las normales (Fig.14). La vinca 31C se puso en contacto con los insectos en diciembre de 2011. En esta ocasión los síntomas comenzaron a observarse después de un mes. Las flores presentaron filodia, virescencia y esterilidad floral. Luego de dos meses de la transmisión, la vinca desarrolló proliferación de brotes con apariencia de escoba de bruja. En mayo, la planta estaba totalmente arrositada, con hojas muy pequeñas y con amarillez generalizada. Finalmente, la vinca murió aparentemente por la presencia del patógeno (Fig.15), mientras las plantas no inoculadas, utilizadas como control, mostraban un desarrollo vegetativo normal. En el caso de Vc 37C, la transmisión se realizó en febrero de 2012. Los síntomas fueron menos notorios, se observó amarillez en las hojas y aborto de algunas flores (Fig. 16).

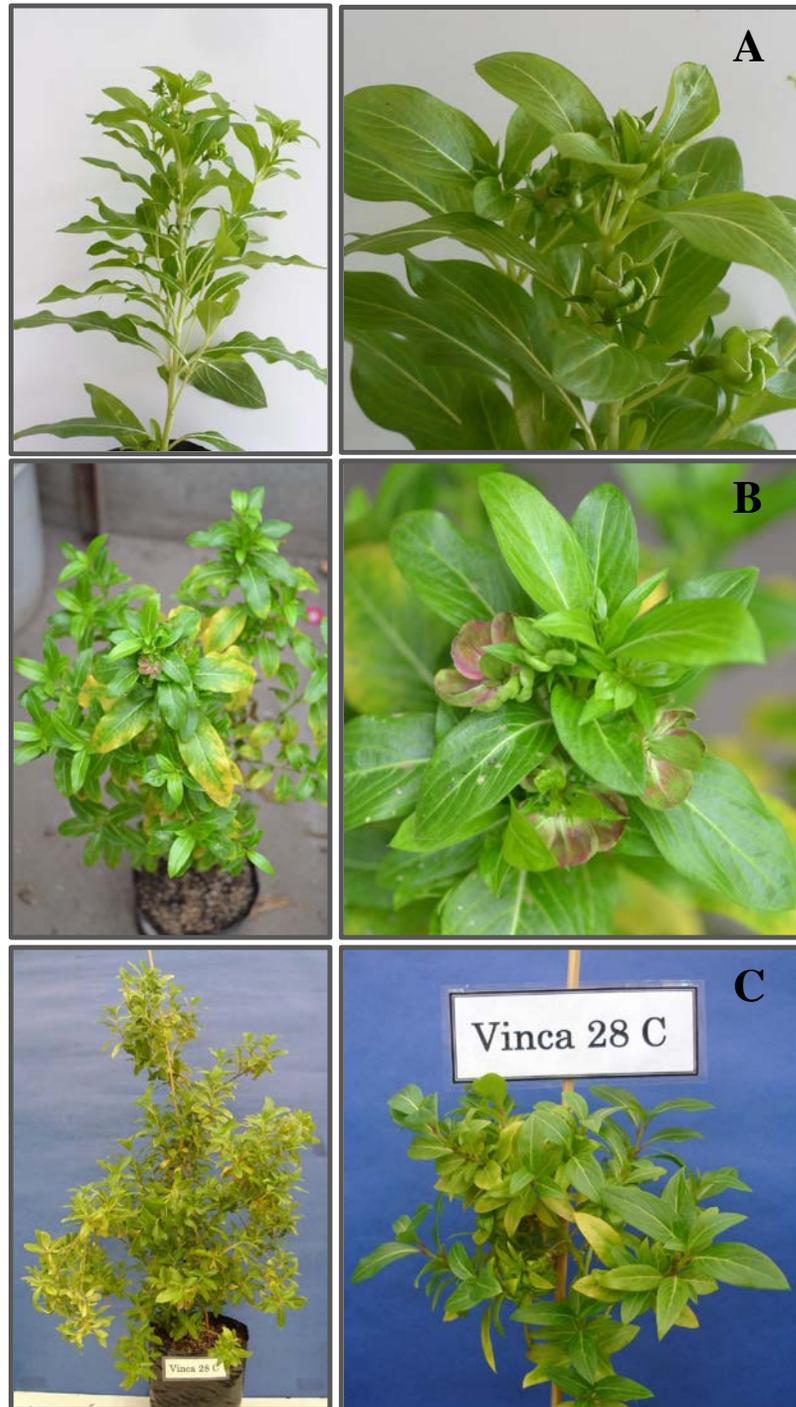


Figura 14. Síntomas de fitoplasmas en vinca Vc 28C. De izquierda a derecha: A) planta a los dos meses de inicio de la prueba de transmisión: flores con virescencia; B) planta a los tres meses de inicio de la prueba de transmisión: flores con virescencia y filodia; C) planta después de un año infectada: hojas pequeñas y amarillas y escoba de bruja.

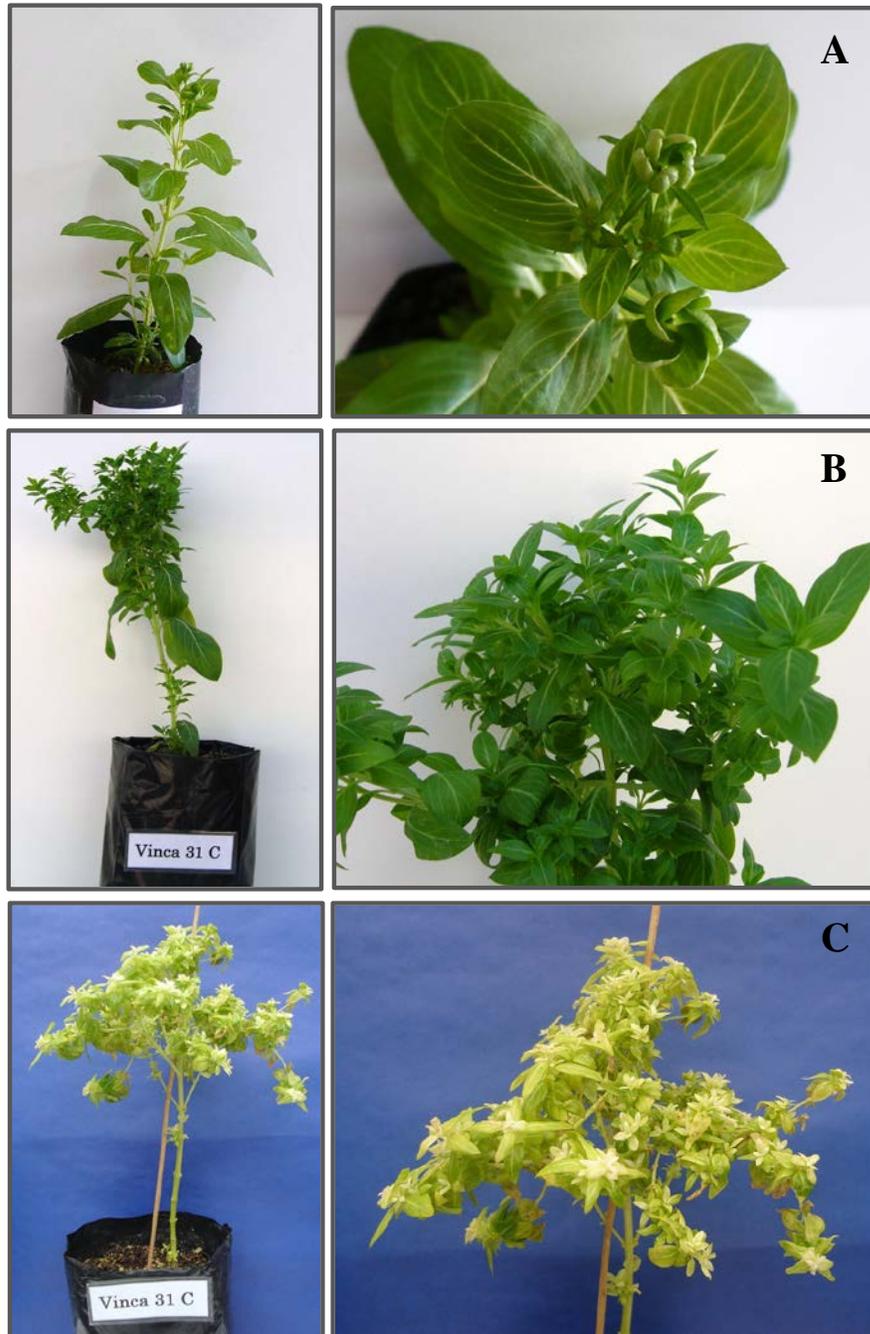


Figura 15. Síntomas de fitoplasmas en vinca Vc 31C. De izquierda a derecha: A) Planta a un mes de la transmisión: flores con filodia y virescencia; B) Planta a dos meses de la transmisión: proliferación de yemas adventicias; C) Planta a los cinco meses: arrosetamiento y amarillez generalizada.



Figura 16. Vinca Vc 37C con leves síntomas de amarillez en hojas.

De las 27 vides puestas a contacto con individuos de *P. exitiosus* colectados en Buin, sólo 2 (7,5%) presentaron algunos de los síntomas de fitoplasmas. La Vid 47 inoculada en octubre 2011, ya en marzo de 2012 presentó síntomas en las hojas, como deformaciones, enrollamiento hacia el envés de la lámina, amarillez y necrosis marginal. En marzo de 2013, presentó hojas deformadas con aspecto ampollado (Fig. 17). La segunda planta, fue la Vid 78A, se inoculó en mayo de 2012; en ella se observó una disminución de crecimiento, con entrenudos cortos y hojas deformes (Fig. 18).

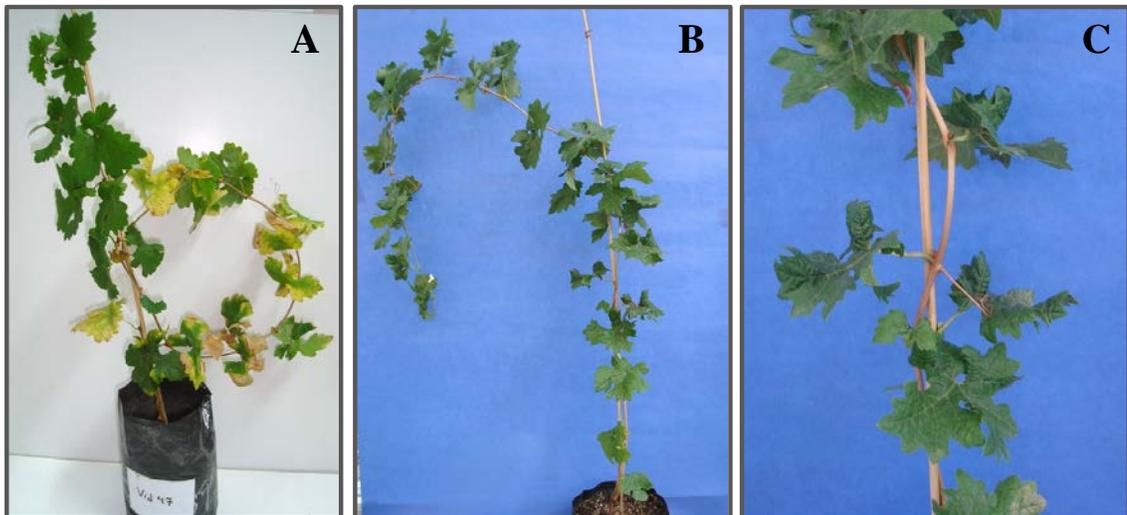


Figura 17. Vid 47 con síntomas de fitoplasmas. A) Planta en marzo de 2012; B) planta en marzo de 2013; C) detalle de hojas deformadas y con aspecto ampollado.



Figura 18. Síntomas en Vid 78A con hojas deformadas y entrenudos cortos.

Individuos de *P. exitiosus* colectados en Pirque, estuvieron en contacto con 18 plantas de vinca, de las cuales 3 (16,6%) presentaron síntomas. La Vc 23C inoculada en octubre, expresó amarilleces en hojas con sus márgenes doblados hacia el envés de la lámina y aborto florales (Fig. 19). En enero fue inoculada la Vc 35B, manifestó proliferación de brotes laterales, hojas con amarilleces y sus márgenes doblados hacia el envés de la lámina (Fig. 20). La tercera planta, Vc 39B estuvo en contacto con los cicadélidos en febrero, expresando síntomas más leves (Fig. 21). En cuanto a las 27 plantas de vides que estuvieron en contacto con los cicadélidos no se observaron síntomas.



Figura 19. Síntoma de amarillez en hojas en vinca Vc 23C.



Figura 20. Vinca Vc 35B con síntomas de amarilleces en hojas, escoba de bruja y márgenes doblados hacia el envés de la lámina.



Figura 21. Vinca Vc 39B con síntoma de amarillez en algunas hojas.

De las 24 plantas de vincas que fueron inoculadas por *P. exitiosus* provenientes de Casablanca, sólo 3 (12,5%) expresaron síntomas de fitoplasmas. Dos plantas de vinca, la Vc 30B y Vc 30C, estuvieron en la misma jaula; se inocularon en noviembre de 2011. En ellas, las hojas presentaban, amarilleces y bordes doblados hacia el envés de la lámina, flores más pequeñas que las normales, abortos florales y proliferación de brotes laterales con entrenudos cortos (Fig. 22 y 23). La vinca Vc 33A, en diciembre de 2011 estuvo en contacto con los insectos. A los tres meses de inoculación, se observaron los primeros síntomas. Las flores presentaban filodia y virescencia muy característico de fitoplasmas. También se observó amarillez en algunas de las hojas. Luego, después de cinco meses la planta se volvió más laxa y flexible (Fig. 24). En cambio, de las 27 plantas de vid que

estuvieron en contacto con *P. exitiosus*, sólo una (3,7%), la Vid 76B inoculada en abril presentó síntomas (Fig. 25).



Figura 22. Vinca Vc 30B con síntomas en hojas con amarilleces y proliferación de brotes laterales.



Figura 23. Vinca Vc 30C con síntoma en hojas con amarillez y dobladas hacia el envés de la lámina y proliferación de brotes laterales.



Figura 24. Síntomas de fitoplasma en vinca Vc 33A inoculada por *P. exitiosus* proveniente del viñedo de Casablanca. A) Planta a los tres meses de infectada: flores con filodia y virescencia; B) Planta a cinco meses infectada: flores con virescencia.



Figura 25. Síntomas en Vid 76B: planta pequeña con hojas enrolladas hacia el envés de la lámina, ramificaciones y lignificación parcial del sarmiento.

Las pruebas de transmisión realizadas con los cicadélidos de *A. curtulus* colectados en los tres viñedos no originaron síntomas de fitoplasma en las plantas de vinca y vid que se utilizaron para los ensayos.

Todas las plantas que se utilizaron como controles (no puesto en contacto con insectos), tanto las vincas y vides no presentaron síntomas de fitoplasmas (Anexo IV).

II.2. Detección de fitoplasmas por nested – PCR

Las 96 plantas de vinca y 117 plantas de vid utilizadas en las pruebas de transmisión se analizaron para el gen *tuf* con los partidores Tuf340/Tuf890 y en nested-PCR con los partidores Tuf400/Tuf835 que amplifican un fragmento de 438 pb. Aquellas plantas de vinca y vid con síntomas o asintomáticas positivas por el gen *tuf*, posteriormente se analizaron para el gen 16S rDNA con los partidores P1/P7 y en nested-PCR con R16F2n/R2, amplificando un fragmento de 1250 pb. Todos los insectos puestos en contacto con las plantas positivas fueron analizados de igual manera. Las plantas utilizadas como controles, resultaron negativas a fitoplasmas. Nueve plantas de vincas con síntomas y cinco plantas de vides, de las cuales dos eran asintomáticas resultaron positivas a fitoplasmas para ambos genes (Cuadro 13). El porcentaje de plantas positivas a la transmisión se detalla en la Cuadro 14. En los insectos *P. exitiosus* que inocularon a dichas plantas durante las pruebas de transmisión, también se detectó la presencia de fitoplasmas (Fig. 26 y Fig. 27). En cambio, las plantas de vincas y vides que fueron puestas en contacto con *A. curtulus* resultaron negativas a fitoplasmas por nested-PCR, aunque algunos de los insectos utilizados para la transmisión resultaron positivos a fitoplasmas.

Cuadro 13. Detección de fitoplasmas por nested-PCR de los genes *tuf* y 16S rDNA en plantas de vinca y vid procedentes de las pruebas de transmisión utilizando *P. exitiosus*.

Buin		Pirque		Casablanca	
Vinca	Vid	Vinca	Vid	Vinca	Vid
Vc 28C	V78A	Vc 23C	V43*	Vc 30B	V76B
Vc 31C	V47	Vc 35B	V61*	Vc 30C	
Vc 37C		Vc 39B		Vc 33A	

*Vides asintomáticas.

Cuadro 14. Porcentaje de plantas positivas a la transmisión de fitoplasmas a vinca y vid por *P. exitiosus* detectado por PCR.

Planta	Buin		Pirque		Casablanca	
	+/t	%	+/t	%	+/t	%
Vinca	3/27	11,11	3/18	16,6	3/24	12,5
Vid	2/27	7,5	2/27	7,5	1/27	3,7

+/t: plantas positivas/plantas analizadas; %: Porcentaje de plantas positivas

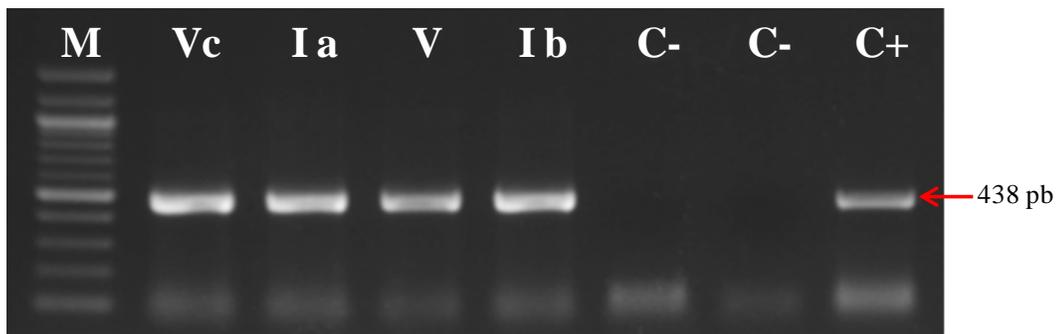


Figura 26. Amplificación a través de nested-PCR con los partidores Tuf400/Tuf835 (gen *tuf*) de plantas de vinca y vid e insectos *P. exitiosus* de las pruebas de transmisión. M: marcador de peso molecular 100 pb; Vc: planta de vinca infectada por fitoplasma; Ia: insecto *P. exitiosus* que inoculó el fitoplasma a la vinca (Vc); V: planta de vid infectada por fitoplasma; Ib: insecto *P. exitiosus* que inoculó el fitoplasma a la vid (V); C-: controles negativos y C+: control positivo.

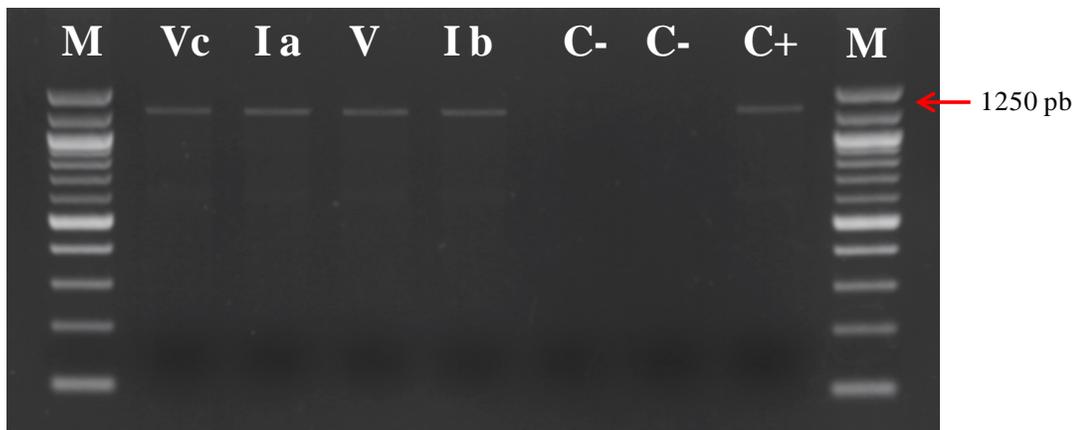


Figura 27. Amplificación a través de nested-PCR con los partidores R16F2n/R2 (gen 16S rDNA) de plantas de vinca y vid e insectos *P. exitiosus* de las pruebas de transmisión. M: marcador de peso molecular 100 pb; Vc: planta de vinca infectada por fitoplasma; Ia: insecto *P. exitiosus* que inoculó el fitoplasma a la vinca (Vc); V: planta de

vid infectada por fitoplasma; Ib: insecto *P. exitiosus* que inoculó el fitoplasma a la vid (V); C-: controles negativos y C+: control positivo.

II.3. Identificación de fitoplasmas por análisis de secuencia y RFLP *in silico*

La identificación de los fitoplasmas se llevó a cabo mediante la secuenciación de los productos de amplificación de los PCR realizados utilizando los genes *tuf* y 16S rDNA de las muestras positivas de vinca, vid y *P. exitiosus*. Las secuencias nucleotídicas obtenidas por ambos genes se alinearon y se compararon con secuencias de fitoplasmas publicadas en GenBank (NCBI) y Q-Bank.

Los productos de amplificación de Tuf400/Tuf835 (438 pb) de los fitoplasmas detectados en vinca, vid y *P. exitiosus* procedentes de las pruebas de transmisión, fueron clonados. Por cada muestra se rescataron cinco clones que se secuenciaron. Las secuencias obtenidas de cada clon referente a una misma muestra fueron idénticas entre sí (100% de identidad nucleotídica). Los porcentajes de identidad entre secuencias nucleotídicas de los fitoplasmas detectados en vincas, vides y *P. exitiosus* utilizados en los ensayos de transmisión, varían de 95,7% a 96,7% en relación a los aislados de fitoplasmas de diferentes subgrupos ribosomales del grupo 16SrIII (Cuadro 15).

Cuadro 15. Porcentaje de similitud de secuencias nucleotídicas entre los aislados de vinca, vid y *P. exitiosus* (gen *tuf*) y los publicados en Q-Bank y GenBank.

Aislado	Código de secuencia	Nº Q-Bank	Nº GenBank	Subgrupo ribosomal	% de identidad ^a
Green valley X phytoplasma	GVX	QPh 127	JQ824252.1	16SrIII-A	96,4
Crepis biennis yellows phytoplasma	CR	QPh 10	JQ824258.1	16SrIII-B	96,4
Goldenrod yellows phytoplasma	GR1	QPh 20	JQ824232.1	16SrIII-D	96,7
Spirea stunt phytoplasma	SP1	QPh 36	JQ824281.1	16SrIII-E	95,7
Milkweed yellows phytoplasma	MW1	QPh 27	JQ824206.1	16SrIII-F	95,9
Poinsettia branch - inducing	PoiBi (JR-1)	QPh 21	- ^b	16SrIII-H	96,4

^a % de identidad nucleotídica de secuencias para Q-Bank y GenBank.

^b No hay secuencias de 16SrIII-H en GenBank.

El análisis de las secuencias de los productos de amplificaciones por nested-PCR del gen *tuf*, indica que los aislados de las pruebas de transmisión son fitoplasmas pertenecientes al grupo ribosomal 16SrIII (X-disease group). Como referencia, el aislado más cercano que no pertenece al grupo ribosomal 16SrIII, considerando identidad nucleotídica, es CPS (JQ824293.1) posee un 77,9% de identidad y pertenece al grupo ribosomal 16SrVI (Clover proliferation group).

Debido al 100% de identidad nucleotídica de las secuencias de los fitoplasmas encontrados en todas las muestras de vinca, vid y *P. exitiosus*, se utilizó una secuencia representante de cada especie, correspondiente al fragmento que amplifica los partidores Tuf400/Tuf835 (438 pb). Los aislados seleccionados para la realización del RFLP *in silico* fueron: Vc 28C para vinca, V 47 para vid e IA3 para *P. exitiosus*.

Con el análisis virtual de RFLP para el gen *tuf*, los perfiles generados de la digestión con la enzima *MseI*, de los aislados de vinca, vid y *P. exitiosus* son idénticos al aislado de CR (Fig 28; Cuadro 15). Posteriormente se eligió una nueva enzima *NdeII* debido a que los porcentajes de identidad no son suficientemente altos como para considerar la pertenencia de los aislados chilenos al subgrupo de referencia de CR, comprobándose que los perfiles de las muestras procedentes de las pruebas de transmisión son diferentes al perfil correspondiente a CR. Esto demuestra que los aislados chilenos no pertenecen a ninguno de los subgrupos ribosomales del grupo 16SrIII disponibles en Genbank y Q-Bank para el gen *tuf* (Cuadro 15). Por lo tanto, se depositará en GenBank y Q-Bank una secuencia nucleotídica del producto de la amplificación del gen *tuf* obtenidas en este estudio (Cuadro 16).

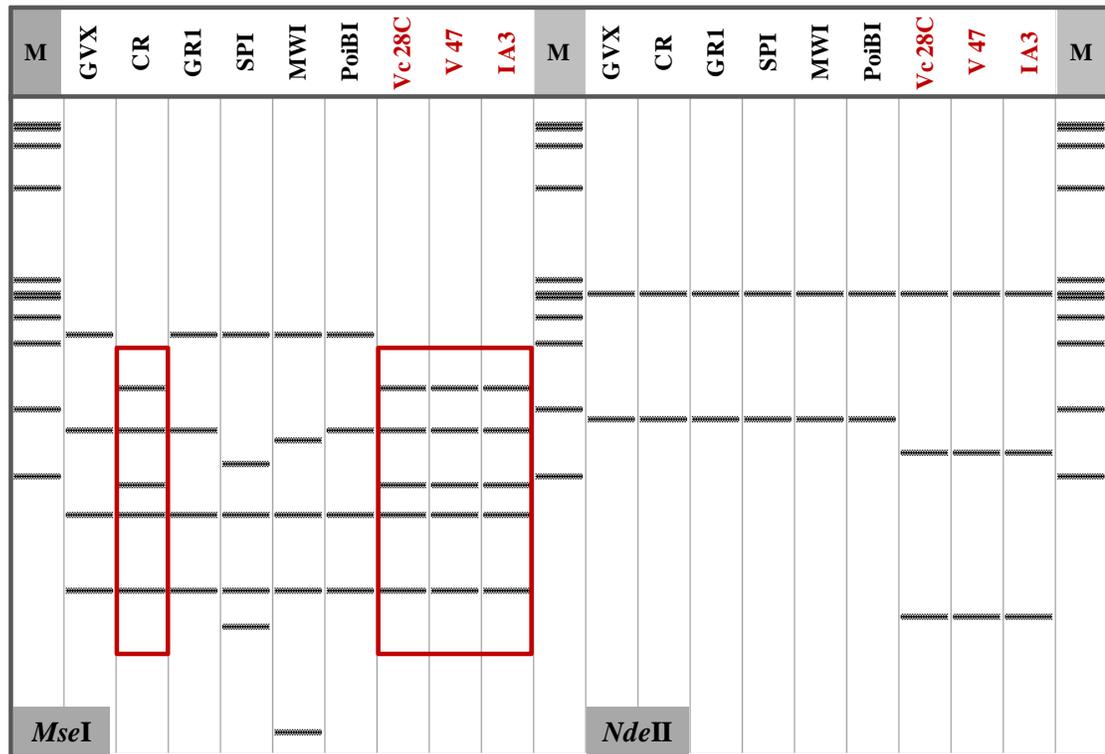


Figura 28. Análisis virtual en gel de poliacrilamida al 6% que muestra algunos de los perfiles de RFLP digeridos con las enzimas *MseI* y *NdeII* de los productos secuenciados en nested-PCR del gen *tuf* de aislados de planta de vinca, vid e insectos *P. exitiosus* provenientes de pruebas de transmisión. Secuencias de fitoplasma utilizadas como referencias: GVX (16SrIII-A), CR (16SrIII-B), GR1 (16SrIII-D), SPI (16SrIII-E), MW1 (16SrIII-F) y PoiBI (16SrIII-H) (Cuadro15). Vc 28C: aislado representativo de vinca de transmisión; V47: aislado representativo de vid de transmisión; IA3: aislado representativo de *P. existiosus*; M: marcador molecular PhiX174.

Cuadro 16. Secuencia nucleotídica obtenida del producto de la amplificación del gen *tuf*, referente de los aislados chilenos.

```

5'- CGTAGATTGTCCTGGACACGCCGATTACATTA AAAATATGATTACTGGTGCTG
CTCAAATGGATGCTGGTATTTTAGTAATTTCTGCTGTTGACGGAATTATGCCTCAA
ACAGAAGAACATATCTTATTAGCTAAACAAGTAGGTGTTCC TAAATTATTAGTTTT
CGTTAACAAATGTGATGTTGTTGCTGATGAAGAGCTTTT AGAATTAGTAGAAATC
GAAATTAGAGAATTATTAACAACATGGCTTTTTAGGCGACGAAGTTCCTATCG
TTAGAGGATCTGCTTTAAAAGCGGTTGAAGGCGACCCTAAATATTTAGAAAAAAT
CCAAGAATTACTTGACTTATTAGACACTTACGTAGAAGATCCAGTTCGTGAAATG
AACAAA - 3'

```

Los productos de amplificación de P1/P7 (1.819 pb) de los fitoplasmas detectados en vinca, vid y *P. exitiosus* procedentes de las pruebas de transmisión, fueron clonados. Por cada muestra se rescataron cinco clones que se secuenciaron. Las secuencias obtenidas de cada clon referente a una misma muestra fueron idénticas entre sí (100% de identidad nucleotídica). Los porcentajes de identidad entre secuencias nucleotídicas de los fitoplasmas detectados en vincas, vides e insectos utilizados en los ensayos de transmisión, indicaron una estrecha correlación entre un 98,9% y un 99,8% con los aislados de referencia del grupo ribosomal 16SrIII (Cuadro 17).

Debido a que existe entre un 99,9% a 100% de identidad nucleotídica entre las muestras de vinca, vid y *P. exitiosus*, se utilizó una secuencia representante de cada especie, correspondiente al fragmento que amplifica los partidores R16F2n/R2 (1250 pb). Los aislados seleccionados para la realización del RFLP *in silico* fueron: Vc 28C para vinca, V 47 para vid e IA3 para *P. exitiosus*.

Cuadro 17. Porcentaje de similitud de secuencias nucleotídicas entre los aislados de vinca, vid y *P. exitosus* (gen 16S rDNA) y los registrados en GenBank.

Aislado	Código de secuencia	N° GenBank	Subgrupo ribosomal	% identidad
Peach X-disease phytoplasma	CX	L33733	16SrIII-A	99,1
Clover yellow edge phytoplasma	CYE-C	AF175304	16SrIII-B	99,4
Pecan bunch phytoplasma	PB1	FJ376626	16SrIII-C	99,3
Goldenrod yellows phytoplasma	GR1	FJ376627	16SrIII-D	99,5
Spiraea stunt phytoplasma	SP1	AF190228	16SrIII-E	99,3
Milkweed yellows phytoplasma	MW1	AF510724	16SrIII-F	99,5
Walnut witches' broom phytoplasma	WWB	AF190226	16SrIII-G	99,3
Poinsettia branch-inducing phytoplasma	PoiBI	AF190223	16SrIII-H	99,3
Virginia grapevine yellows phytoplasma	VGYIII	AF060875	16SrIII-I	99,3
Chayote witches' broom phytoplasma	ChWBIII (Ch10)	AF147706	16SrIII-J	99,8
Strawberry leafy fruit phytoplasma	SLF	AF274876	16SrIII-K	99,5
Poinsettia exuberant flower-inducing phytoplasma	EF-MM	EU169138	16SrIII-L	99,6
Montana potato purple top phytoplasma	PPT-MT117-1	FJ226074	16SrIII-M	99,2
Alaska potato purple top phytoplasma	PPT-AK6	FJ376629	16SrIII-N	99,0
Dandelion virescence phytoplasma	DanVir	AF370120	16SrIII-O	99,4
Dandelion virescence phytoplasma	DanVir	AF370119	16SrIII-P	99,2
Black raspberry witches'-broom phytoplasma	BRWB7	AF302841	16SrIII-Q	99,6
Cirsium white leaf phytoplasma	CirWL	AF373105	16SrIII-R	99,3
Western peach X-disease phytoplasma	WX	L04682	16SrIII-S	98,9

La digestión se realizó con las enzimas *HhaI*, *BstUI* y *RsaI*. Los perfiles de digestión virtual con la enzima *HhaI* (Fig. 29), muestran que los aislados de vinca, vid e insecto son iguales a los perfiles de los aislados PB1, GR1, MW1, Ch10, PPT-MT117-1, PPT-AK6 y BRWB7 (Cuadro 17). Luego, para continuar con la identificación de los aislados chilenos, se realizó una segunda digestión virtual con la enzima *BstUI* que generó perfiles idénticos a los aislados Ch10 y BRWB7 (Fig. 30). Finalmente, se realizó una tercera digestión virtual con la enzima *RsaI* que confirmó que los aislados de vinca, vid y *P. exitiosus* coinciden con el aislado Ch10, fitoplasma perteneciente al subgrupo ribosomal 16SrIII-J (Fig. 31), correspondiente al fitoplasma “escoba de bruja del chayote” de Brasil (Montano *et al.*, 2000), coincidiendo con el mayor porcentaje de identidad presentado en el Cuadro 17.

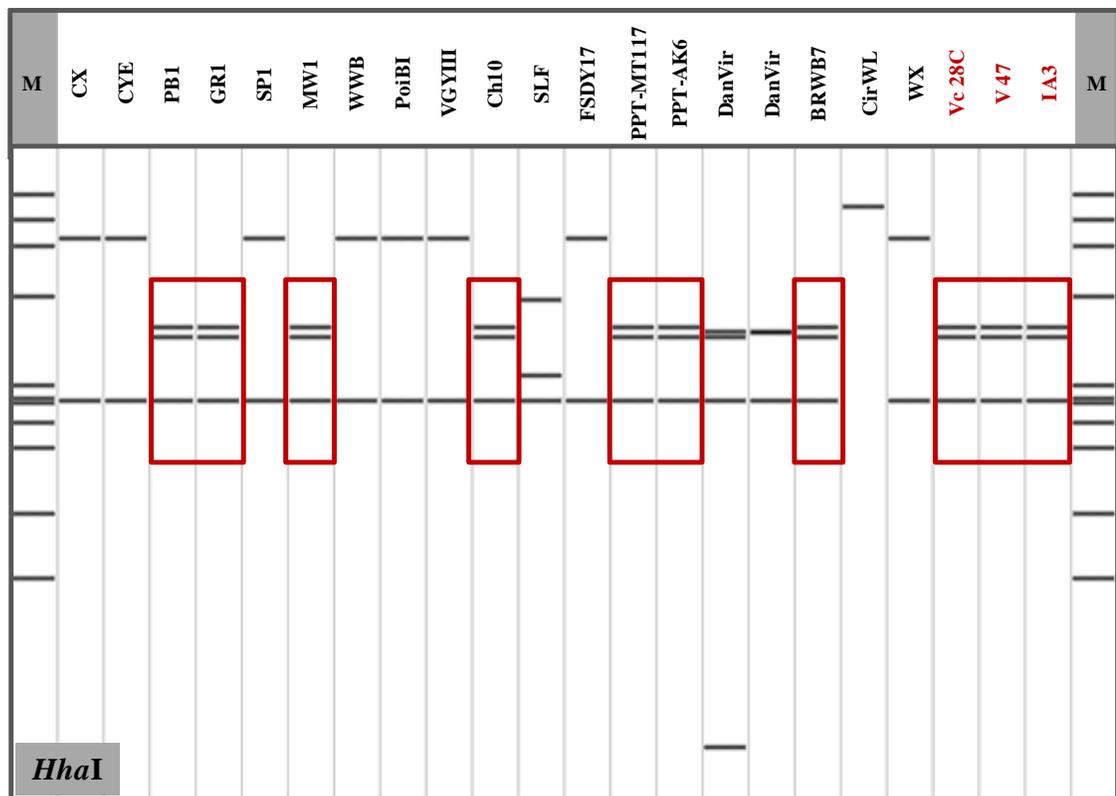


Figura 29. Perfiles de RFLP *in silico* digeridos con la enzima *HhaI* de las secuencias de los fragmentos amplificadas en nested-PCR con R16F2n/R2 del gen 16S rDNA de aislados de planta de vinca, vid y *P. exitiosus* provenientes de pruebas de transmisión. Fitoplasmas de referencias al grupo ribosomal 16SrIII: CX (16SrIII-A), CYE (16SrIII-B), PB1 (16SrIII-C), GR1 (16SrIII-D), SP1 (16SrIII-E), MW1 (16SrIII-F), WWB (16SrIII-G), PoiBI (16SrIII-H), VGYIII (16SrIII-I), Ch10 (16SrIII-J), SLF (16SrIII-K), FSDY17 (16SrIII-L), PPT-MT117-1 (16SrIII-M), PPT-AK6 (16SrIII-N), Dan Vir (16SrIII-O), Dan Vir (16SrIII-P), BRWB7 (16SrIII-Q), CirWL (16SrIII-R) y WX (16SrIII-S) (Cuadro 17). Vc 28C: aislado representativo de vinca de transmisión; V 47: aislado representativo de vid de transmisión; IA3: aislado representativo de *P. existiosus*. M: marcador marcado PhiX174.

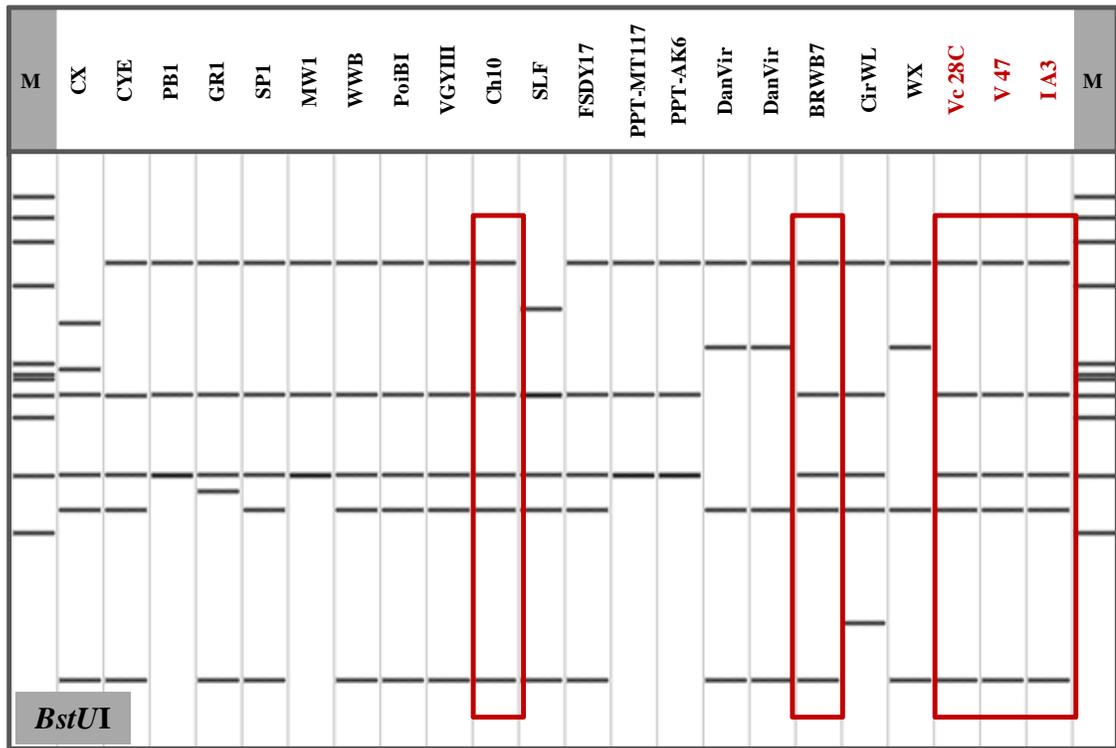


Figura 30. Perfiles de RFLP *in silico* digeridos con la enzima *BstUI* de las secuencias de los fragmentos amplificados en nested-PCR con R16F2n/R2 del gen 16S rDNA de aislados de planta de vinca, vid y *P. exitiosus* provenientes de pruebas de transmisión. Fitoplasmas de referencias al grupo ribosomal 16SrIII: CX (16SrIII-A), CYE (16SrIII-B), PB1 (16SrIII-C), GR1 (16SrIII-D), SP1 (16SrIII-E), MW1 (16SrIII-F), WWB (16SrIII-G), PoiBI (16SrIII-H), VGYIII (16SrIII-I), Ch10 (16SrIII-J), SLF (16SrIII-K), FSDY17 (16SrIII-L), PPT-MT117-1 (16SrIII-M), PPT-AK6 (16SrIII-N), Dan Vir (16SrIII-O), Dan Vir (16SrIII-P), BRWB7 (16SrIII-Q), CirWL (16SrIII-R) y WX (16SrIII-S) (Cuadro 17). Vc 28C: aislado representativo de vinca de transmisión. V47: aislado representativo de vid de transmisión. IA3: aislado representativo de *P. existiosus*. M: marcador molecular PhiX174.

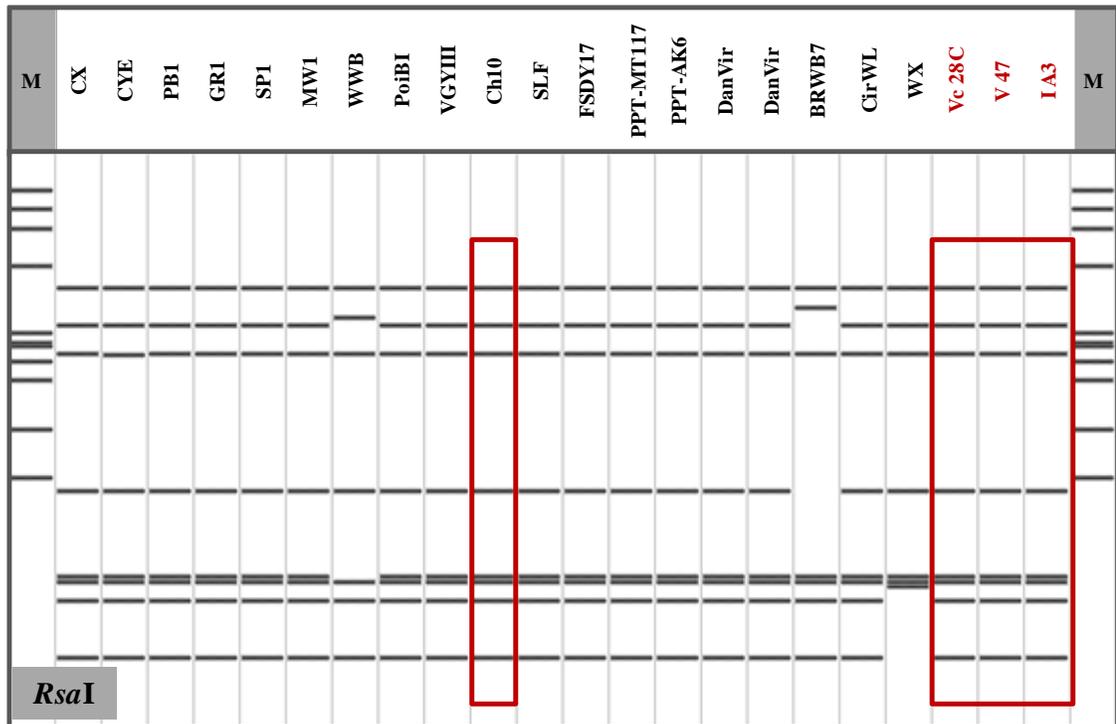


Figura 31. Perfiles de RFLP *in silico* digeridos con la enzima *RsaI* de las secuencias de los fragmentos amplificados en nested-PCR con R16F2n/R2 del gen 16S rDNA de aislados de planta de vinca, vid y *P. exitiosus* provenientes de pruebas de transmisión. Fitoplasmas de referencias al grupo ribosomal 16SrIII: CX (16SrIII-A), CYE (16SrIII-B), PB1 (16SrIII-C), GR1 (16SrIII-D), SP1 (16SrIII-E), MW1 (16SrIII-F), WWB (16SrIII-G), PoiBI (16SrIII-H), VGYIII (16SrIII-I), Ch10 (16SrIII-J), SLF (16SrIII-K), FSDY17 (16SrIII-L), PPT-MT117-1 (16SrIII-M), PPT-AK6 (16SrIII-N), Dan Vir (16SrIII-O), Dan Vir (16SrIII-P), BRWB7 (16SrIII-Q), CirWL (16SrIII-R) y WX (16SrIII-S) (Cuadro 17). Vc 28C: aislado representativo de vinca de transmisión. V 47: aislado representativo de vid de transmisión. IA3: aislado representativo de *P. exitiosus*. M: marcador molecular PhiX174.

DISCUSIÓN

En este estudio, las dos especies de auquenorrincos más abundantes y halladas frecuentemente durante el ciclo vegetativo de la vid correspondieron a *P. exitiosus* y *A. curtulus* y se utilizaron para la realización de las pruebas de transmisión (de septiembre de 2011 a mayo de 2012). La sobrevivencia de los adultos de *P. exitiosus* en transmisión, fue mayor cuando estuvieron en contacto con plantas de vinca que en vid. La sobrevivencia de *A. curtulus* fue de hasta 4 días tanto en plantas de vid como en vinca.

Se demostró que *P. exitiosus* capturados en los tres viñedos, transmitió el fitoplasma del subgrupo ribosomal 16SrIII-J (X-disease group) a nueve plantas de vinca, todas sintomáticas: amarilleces en hojas, filodia, virescencia y “escoba de bruja”; síntomas que coinciden con aquellos descritos por los autores Chang (1998), Omar *et al.* (2008), Chaturvedi *et al.* (2009) y Nejat *et al.* (2010). *P. exitiosus* también logró transmitir el fitoplasma 16SrIII-J en cinco plantas de vid; sólo tres expresaron síntomas: entrenudos cortos y deformación de hojas con aspecto ampollado; dos vides fueron asintomáticas. Los bajos porcentajes de transmisión obtenidos durante este estudio, no deben inducirnos a minimizar la importancia de los fitoplasmas; Hanboonsong *et al.* (2006) mencionan que la tasa de expresión de síntomas de fitoplasmas en las plantas utilizadas en pruebas de transmisión, normalmente es baja; Maixner *et al.* (2000) informaron que *Oncopsis alni* (Schrank) ha logrado transmitir el fitoplasma alder yellows (16SrV-C) a vid con un éxito del 3,5% (3 de 88 plantas utilizadas en transmisión); el 2% (1 de 50 plantas usadas en transmisión) de plantas de duraznero resultaron infectadas por el 'Ca. Phytoplasma pronorum' transmitidos a través *Cacopsylla pruni* (Scopoli) (Jarausch *et al.*, 2001).

Paratanus. exitiosus demuestra ser un cicadélido vector de fitoplasmas, endémico en Chile y en América del Sur en general. Se indica la capacidad de transmitir fitoplasma en el cultivo de la remolacha en Chile, causando la enfermedad denominada “marchitez amarilla” (Hepp y Vargas, 2001); en Perú transmitiendo fitoplasma en zanahoria (Gamarra, 2011); en Argentina fue definido como potencial vector de la “tristeza del ajo” (Catalano, 2011). Si bien, en los tres casos se trata del mismo grupo ribosomal 16SrIII, no han habido mayores indicaciones acerca del subgrupo de fitoplasmas involucrados en estas enfermedades.

Paratanus. exitiosus vive en asociación con las malezas, con preferencia a correhuela y sanguinaria, esto se observó en los tres viñedos; cuando estas se eliminan, el insecto puede visitar casualmente plantas de vid para alimentarse. Por lo tanto, la alta prevalencia del insecto en los tres viñedos, sugiere que este podría favorecer notablemente la dispersión del fitoplasma 16SrIII-J en la vid en Chile. El mismo comportamiento se ha observado en el cultivo de la remolacha en Chile (Casals *et al.*, 1995); también en el cultivo de ajo en Argentina. La ocurrencia de este cicadélido y otros, posiblemente no se debe solo al estado fenológico del cultivo sino también a la presencia de la vegetación espontánea que se desarrolla dentro o en los bordes del cultivo (Catalano, 2011);

correhuela y ortiga (*Urtica dioica*) son comunes en los viñedos europeos y se comportan como fuente de inóculo del fitoplasma 16SrXII-A, que es transmitido a la vid por el cix

ido polífago *H. obsoletus* (Maixner *et al.*, 1995; Marcone *et al.*, 1997; Berger *et al.*, 2009).

En cuanto a *A. curtulus* la transmisión de fitoplasmas en vinca y vid no se logró. Arismendi *et al.* (2011b) detectaron el fitoplasma 16SrIII-J en el cicadélido. Estudios de transmisión realizados por el mismo autor (Arismendi *et al.*, 2011a), demostraron que *A. curtulus* tiene la capacidad de transmitir el fitoplasma 16SrV-A de murta (*Ugni molinae* Turcz) a ballica (*Lolium multiflorum* Cv. Tama), con un periodo de inoculación de 7 días y después de un periodo de latencia (PL) de 20 días, en condiciones controladas. La literatura indica que individuos de *Cacopsylla pyri* (vector del fitoplasma del decaimiento del peral), a pesar de haber adquirido el patógeno, en algunos casos no logran transmitirlo. Esto depende de varios factores, como la susceptibilidad de la planta usada en el ensayo y el largo del PL del fitoplasma en el vector (Carraro *et al.*, 2001). En nuestro caso, se pueden definir dos escenarios: las plantas utilizadas para el ensayo de transmisión no pudieron ser inoculadas con el fitoplasma ó las plantas fueron inoculadas, pero el título del fitoplasma resultó ser tan bajo de no poder ser detectado con las técnicas moleculares disponibles hoy en día (Berges *et al.*, 2000). A la luz de estos antecedentes, es muy probable que la transmisión por *A. curtulus* haya fallado por el bajo periodo de sobrevivencia del insecto (no más de 4 días) en las mayoría de las pruebas de transmisión. En el caso de Buin, donde la sobrevivencia fue 12 y 8 días respectivamente en vinca y vid, la transmisión no se logró probablemente porque los insectos murieron antes de completar el PL. De hecho, los análisis de nested-PCR realizados en *A. curtulus* indican que fueron varios los individuos positivos al fitoplasma del subgrupo ribosomal 16SrIII-J, que estuvieron en contacto con las plantas en transmisión (datos no mostrados). Para definir si *A. curtulus* es o no vector del fitoplasma 16SrIII-J, es aconsejable repetir las pruebas de transmisión utilizando individuos que proceden de cría y que se hayan alimentado con plantas infectadas por el fitoplasma.

En los viñedos de Pirque y Casablanca, la población de *A. curtulus* fue abundante, probablemente debido a la presencia de gramíneas. Esto concuerda con lo dicho por Arismendi *et al.* (2011a) que indica haber capturado el cicadélido en gramíneas asociadas a plantas de murta. Arocha *et al.* (2005) detectaron el fitoplasma 16SrXIV en caña de azúcar y papaya, reconociendo un rol importante, como reservorios del fitoplasma, a las malezas presentes en y alrededor de las plantaciones. Estas malezas son eficientes reservorios de fitoplasmas cuando presentan síntomas, como es el caso *Cynodon dactylon* (L.), pero también cuando son asintomáticas, como en *Sorghum halepense* (L.). También, Rao *et al.* (2010) detectaron el fitoplasma en las malezas *Oplismenus burmannii* (Retz.) y *Digitaria sanguinalis* (L.). Esta última gramínea es frecuente en los viñedos y se observó también en el viñedo de Pirque. Actualmente se difunde el uso de sembrar gramíneas en los viñedos para mejorar la estructura del suelo, sin embargo hay que tener presente que

esto significa promover condiciones favorables para la diseminación de enfermedades causadas por fitoplasmas.

CONCLUSIONES

Bajo las condiciones en que se realizó este estudio y la metodología utilizada, los resultados obtenidos permiten señalar lo siguiente:

Los cicadélidos que se encontraron con mayor frecuencia en los viñedos fueron *A. curtulus* y *P. exitiosus*.

No se logró la transmisión de fitoplasmas a plantas de vincas y vides a través de adultos de *A. curtulus* capturados en los viñedos.

Plantas de vincas y vides colocadas en contacto con adultos de *P. exitiosus* expresaron síntomas causados por fitoplasmas.

Se detectó e identificó el fitoplasma perteneciente al subgrupo ribosomal 16SrIII-J en plantas de vincas, vides e insectos de *P. exitiosus* utilizados en las pruebas de transmisión.

Este es el primer reporte de transmisión del fitoplasma 16SrIII-J en vinca y vid realizada por adultos de *P. exitiosus* capturados en viñedos.

Se concluye que *P. exitiosus* es vector del fitoplasma 16SrIII-J (X-disease group).

BIBLIOGRAFÍA

Agrios, G.N. 2005. Plant Pathology. Fifth Edition. Academic Press. New York, USA. 922p.

Alma, A., D. Bosco, A. Danielli, A. Bertaccini, M. Vibio and A. Arzone. 1997. Identification of phytoplasmas in eggs, nymphs and adults of *Scaphoideus titanus* Ball reared on healthy plants. *Insect Molecular Biology* 6: 115-121.

Arismendi, N., R. Carrillo and R. Riegel. 2011a. Transmission *in vivo* of elm yellows phytoplasma (16SrV) by *Amplipcephalus curtulus* (Hemiptera: cicadellidae) in ryegrass (*Lolium multiflorum* cv. Tama). Pp79 *In: Hemipteran-Plant Interactions Symposium*. Piracicaba, San Pablo, Brasil July 11-14, 2011. Universidad de San Pablo. ESALQ, Piracicaba, Brazil.

Arismendi, N., N. Andrade, R. Riegel, A. Zamorano, and N. Fiore. 2011b. Molecular identification of 16SrIII-J and 16SrV-A phytoplasmas in *Ugni molinae* and *Amplipcephalus curtulus*. Pp 11-12. *In: XX Congreso Sociedad Chilena de Fitopatología*. Santiago, Chile 29-30 Noviembre - 01 Diciembre, 2011. Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. Santiago, Chile.

Arocha, Y., M. López, B. Piñol, M. Fernández, S. Picornell, R. Almeida, I. Palenzuela, M.R. Wilson and P. Jones. 2005. ‘*Candidatus* Phytoplasma graminis’ and ‘*Candidatus* Phytoplasma caricae’, two novel phytoplasmas associated with diseases of sugarcane, weeds and papaya in Cuba. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55: 2451-2462.

Auger, J. y M. Esterio, 1997. Control integrado de *Botrytis cinerea* Pers. En vid (*Vitis vinifera* L.). Pp 14-25. *In: Esterio, M. y Auger J. Botrytis: Nuevas estrategias de control cultural, biológico y químico en uva de mesa*. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Santiago, Chile.

Auger, J., I. Pérez, M. Esterio, W.D. Gubler, and A. Eskalen. 2004. First report of *Phaeomoniella chlamydospora* on *Vitis vinifera* and French American hybrids in Chile. *Plant Disease* 88:1285.

Auger, J., N. Aguilera and M. Esterio. 2005a. Identification of basidiomycete species associated with wood decay symptoms of grapevine chlorotic leaf roll in Chile. *Phytopathologia Mediterranea* 44: 86. Abstract.

Auger, L., I. Pérez, M. Esterio, V. Navia, W.D. Gubler and A. Eskalen. 2005b. Fungi associated with grapevine wood decay and young vine decline in Chile. *Phytopathologia Mediterranea* 44:89-90. Abstract.

- Auger, J., M. Esterio and I. Pérez. 2007. First report of black foot disease of grapevine caused by *Cylindrocarpon macrodidymum* in Chile. *Plant Disease* 91: 4, 470.
- Beanland, L., C.W. Hoy, S.A. Miller and L.R. Nault. 2000. Influence of aster yellows phytoplasma on the fitness of aster leafhopper (Homoptera: Cicadellidae). *Annals of the Entomological Society of America* 93: 271-276.
- Beanland, L. and T. Wolf. 2003. Possible insect vectors of North American grapevine yellows phytoplasma in Virginia. Pp 64-65. *In: 14th ICVG Meeting*. Locorotondo, Bari, Italy. September 12-17, 2003. Locorotondo, Bari, Italy.
- Belli, G., P.A. Bianco and M. Conti. 2010. Grapevine yellows in Italy: past, present and future. *Journal of Plant Pathology* 92 (2): 303-326.
- Berger, J., W. Schweigkofler, C. Kerschbamer, C. Roschatt, J. Dalla Via and S. Baric. 2009. Occurrence of Stolbur phytoplasma in the vector *Hyalesthes obsoletus*, herbaceous host plants and grapevine in South Tyrol (Northern Italy). *Vitis* 48 (4): 185-192.
- Berges, R., M. Rott and E. Seemüller. 2000. Range of phytoplasma concentrations in various plant hosts as determined by competitive polymerase chain reaction. *Phytopathology* 90: 1145-1152.
- Bertaccini, A., S. Botti, N. Fiore, A. Gajardo and J. Montealegre. 2004. Identification of a new phytoplasma(s) infecting grapevine with yellows in Chile. Pp 63-64. *In: 15th Congress of IOM*. Athens Georgia, USA July 11-16, 2004. Athens Georgia, USA.
- Bertaccini, A. 2007. Phytoplasmas: diversity, taxonomy and epidemiology. *Frontiers in Bioscience* 12: 673-689.
- Bertaccini, A. and B. Duduk. 2009. Phytoplasma and phytoplasma diseases: a review of recent research. *Review Phytopathology Mediterranea* 48: 355-378.
- Boudon-Padieu, E. 2003. The situation of grapevine yellows and current research directions: distribution, diversity, vectors, diffusion and control. Pp 47-53. *In: 14th ICVG Meeting*. Locorotondo, Bari, Italy. September 12-17, 2003. Locorotondo, Bari, Italy.
- Braccini, P., A. Sfalanga, M. Martini, M. Pondrelli and A. Bertaccini. 1999. Diffusione di fitoplasmosi in vigneti della Toscana centrale. *Petria* 10: 177-178.
- Bressan, A., D. Clair, O. Sémétey and E. Boudon-Padieu. 2005a. Effect of two strains of Flavescence dorée phytoplasma on the survival and fecundity of the experimental leafhopper vector *Euscelidius variegatus* Kirschbaum. *Journal of Invertebrate Pathology* 89: 144-149.

- Bressan, A., V. Girolami and E. Boudon-Padieu. 2005b. Reduced fitness of the leafhopper vector *Scaphoideus titanus* exposed to Flavescence dorée phytoplasma. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 115: 283-290.
- Carraro, L., N. Loi and P. Ermacora. 2001. Transmission characteristics of the European stone fruit yellows phytoplasma and its vector *Cacopsylla pruni*. *European Journal of Plant Pathology* 107: 695-700.
- Catalano, M.I. 2011. Cicadélidos vectores de fitoplasmas a cultivos de importancia económica en la Argentina Sistemática y bioecología (Insecta-Auchenorrhyncha-Cicadellidae). Tesis Doctoral en Ciencias Naturales, Entomología-Fitopatología. Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Naturales y Museo. La Plata, Argentina. 134p.
- Caudwell, A. 1988. Bois noir and Vergilbungs-krankheit. Other grapevine yellows. Pp 45-47. *In: Compendium of Grapes Diseases*. R. C. Pearson and A. C. Goheen (Ed). American Phytopathological Society Press, St. Paul, Minnesota, USA.
- Caudwell, A. 1993. Advances in grapevine yellows research since 1990. Pp 79-93. *In: Extended Abstracts 11th ICVG Meeting*. Montreux, Suiza. September 6-9, 1993. Montreux, Suiza.
- Chang, C.J. 1998. Pathogenicity of aster yellows phytoplasma and *Spiroplasma citri* on periwinkle. *Phytopathology* 88:1347-1350.
- Chaturvedi, Y., A.K. Tewari, P.P. Upadhyaya, S.K. Prabhuji and G.P. Rao. 2009. Association of '*Candidatus* phytoplasma asteris' with little leaf and phyllody disease of *Catharanthus roseus* in Eastern Uttar Pradesh, India. *Medicinal Plants* 1(2): 103-108.
- Contaldo, N., A. Bertaccini, S. Paltrinieri, H.M. Windsor and G.D. Windsor. 2012. Axenic culture of plant pathogenic phytoplasmas. *Phytopathologia Mediterranea* 51 (3): 607-617.
- Conti, M. 2001. Giallumi della vite. *Informatore Fitopatologico* 4: 35-40.
- Cousin, M.T. 1995. Phytoplasmes et phytoplasmoses. *Agronomie* 15: 245-264.
- Cruz Aguayo, M. 2004. Enfermedades de la vid en el secano interior de la VII y VII regiones de Chile. Manejo integrado. *Boletín INIA N°111 La Platina* 53-55.
- Deng, S. and C. Hiruki. 1991. Amplification of 16s rRNA genes from culturable and non-culturable mollicutes. *Journal of Microbiological Methods* 14: 53-61.
- Doi, Y., M. Teranaka, K. Yora and H. Asuyama. 1967. Mycoplasma or PLT grouplike microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf,

potato witches' broom, aster yellows or pawlownia witches' broom. Annual Phytopathology Society Japan 33: 259-266.

Engel, E.A., P. Escobar, C. Montt, S. Gómez Talquenca and P.D.T. Valenzuela. 2008. First report on the occurrence of *Grapevine leafroll-associated virus 7* and 9 in Chilean grapevines. Plant Disease 92 (8): 1252.

Engel, E.A., P.F. Escobar, P.A. Rivera and P.D.T. Valenzuela. 2010a. First report on the occurrence of *Grapevine leafroll-associated virus 5* in Chilean grapevines. Plant Disease 94 (8): 1067.

Engel, E.A., P.A. Rivera and P.D.T. Valenzuela. 2010b. First report of *Grapevine Syrah virus-1* in Chilean grapevines. Plant Disease 94 (5): 633.

Escobar, P.F., N. Fiore, P.D.T. Valenzuela and E.A. Engel. 2008. First detection of *Grapevine leafroll-associated virus 4* in Chilean grapevines. Plant Disease 92: 1474.

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

Fiore, N., S. Prodan, J. Montealegre, E. Aballay, A.M. Pino and A. Zamorano. 2008. Survey of grapevine viruses in Chile. Journal of plant pathology 90 (1): 125-130.

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

Gamarra, D., A. Olórtegui, E. Mayta, P. Lozada, R. Ramírez, W. Cuellar, I. Bartolini y O. Pinillos. 2011. Caracterización molecular y transmisión de fitoplasmas que infectan zanahoria en el Valle del Mantaro. Pp 116. *In: XX Reunión científica ICBAR*. Lima, Perú 16-19 Agosto, 2011. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.

Garcia-Salazar, C., M.E. Whalon and U. Rahardja. 1991. Temperature-dependent pathogenicity of the X-Disease mycoplasmalike organism to its vector: *Paraphlepsius irroratus* (Homoptera: Cicadellidae). Environmental Entomology 20:179-84.

González, F., S. Paltrinieri, A. Calari, A. Bertaccini, A. Alma, L. Picciau, J. Araya and N. Fiore. 2008. Phytoplasmas associated with grapevine in Chile: Potential insects vectors and reservoirs. *In: II International Phytoplasma Workshop*. La Habana, Cuba September 22-26.

González, F., A. Zamorano, A.M. Pino y N. Fiore. 2010. Caracterización molecular de nuevos fitoplasmas en la vid en Chile. Pp 50. *In: XIX Congreso Sociedad Chilena de*

Fitopatología, Pucón, Chile 9-12 noviembre, 2010. Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Pucón, Chile.

Gundersen, D.E. and I.M. Lee. 1996. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathologia Mediterranea* 35: 144-151.

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

Hanboonsong, Y., W. Ritthison, C. Choosai and P. Sirithorn. 2006. Transmission of sugarcane white leaf phytoplasma by *Yamatotettix flavovittatus*, a new leafhopper vector. *Journal Economic Entomology* 99: 1531-1537.

Hepp, R. y M. Vargas. 2001. Detección por PCR del agente causal de la marchitez amarilla de la remolacha en cicadélidos (Homóptera: Cicadellidae) asociados al cultivo de la remolacha. *In: XI Congreso Nacional de Fitopatología, Santa Cruz, Chile. Fitopatología* 37: 67-108.

Herrera, M.G. and V.M. Madariaga. 2003. Evidencias inmunológicas, microscópicas y moleculares de la presencia de fitoplasmas en vides. *Agricultura Técnica* 63:15-22.

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

IRPCM Phytoplasma/ Spiroplasma Working Team Phytoplasma taxonomy group. 2004. Description of the genus '*Candidatus Phytoplasma*', a taxon for the wall-less nonhelical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54: 1243-1255.

Jarausch, W., J.L. Danet, G. Labonne, F. Dosba, J.M. Broquaire, C. Saillard and M. Garnier. 2001. Mapping the spread of apricot chlorotic leaf roll (ACLR) in southern France and implication of *Cacopsylla pruni* as a vector of European stone fruit yellows (ESFY) phytoplasmas. *Journal Plant Pathology* 50: 782-790.

Lee, I.M., D.E. Gundersen Rindal, R.E. Davis and I.M. Bartoszyk. 1998. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48: 1153-1169.

Lee, I.M., R.E. Davis and D.E. Gundersen Rindal. 2000. Phytoplasma: Phytopathogenic Mollicutes. *Annual Review of Microbiology* 54: 221-55.

Lee, I.M., Y. Zhao and R.E. Davis. 2009. Prospects of multiple gene-based systems for differentiation and classification of phytoplasmas. Chapter: 4 Pp 51. *In: Phytoplasmas:*

Genomes, Plant Hosts and Vectors. Edited by Weintraub, P. G., Gilat Research Center, Israel and Jones, P., Rothamsted Research, UK 336 p.

Lessio, F., S. Palermo, R. Tedeschi and A. Alma. 2003. Presence of grapevine yellows phytoplasmas vectors (Homoptera, Auchenorrhyncha) in northwestern Italy. Pp 75-76. *In*: 14th Meeting of ICVG, Locorotondo, Bari, Italy September 12-17, 2003. Locorotondo, Bari, Italy.

Longone, V., F. González, A. Zamorano, A.M. Pino, A. Jaraya, V. Díaz, S. Paltrinieri, A. Calari, A. Bertaccini, L. Picciau, A. Alma and N. Fiore. 2011. Epidemiological aspects of phytoplasmas in Chilean Grapevines. *Bulletin of Insectology* 64: (S91-S92) 1721-8861.

Madden, L.V. and L.R. Nault. 1983. Differential pathogenicity of corn stunting mollicutes to leafhopper vectors in *Dalbulus* and *Balbulus* species. *Phytopathology* 73: 1608-1614.

Maixner, M. 2010. Phytoplasma epidemiological systems with multiple plant hosts. Pp 213-232. *In*: Weintraub, P.G. and Jones, P. *Phytoplasma: Genomes, plant hosts and vectors*. CABI, London, UK. 331p.

Maixner, M., W. Reinert and H. Darimont. 2000. Transmission of grapevine yellows by *Oncopsis alni* (Schrank) (Auchenorrhyncha: Macropsinae). *Vitis* 39: 83-84.

Maixner, M., U. Ahrens and E. Seemüller. 1995. Detection of the German grapevine yellows (Vergilbungs-krankheit) MLO in grapevine, alternative hosts and a vector by a specific PCR procedure. *European Journal Plant Pathology* 101: 241-250.

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

Marcone, C., A. Ragozzino and E. Seemüller. 1997. Deteccion and identification of phytoplasmas in yellows-diseased weed in Italy. *Plant Pathology* 46:530-537.

Montano, H.G., R.E. Davis, E.L. Dally, J.P. Pimentel and P.S.T. Brioso. 2000. Identification and phylogenetic analysis of a new phytoplasma from diseased chayote in Brazil. *Plant Disease* 84 (4): 429-436.

Mujica, F. y C. Vergara. 1980. *Flora Fungosa Chilena*. Segunda edición. Editorial Universitaria, Santiago, Chile. 308 pp.

Murrall, D.J., L.R. Nault, C.W. Hoy, L.V. Madden and S.A. Miller. 1996. Effects of temperature and vector age on transmission of two Ohio strains of Aster Yellows

phytoplasma by the aster leafhopper (Homoptera: Cicadellidae). *Journal of Economic Entomology* 89: 1223-1232.

Nejat, N., K. Sijam, S.N.A. Abdullah, G. Vadamalai and M. Dickinson. 2010. Molecular characterization of an aster yellows phytoplasma associated with proliferation of periwinkle in Malaysia. *African Journal of Biotechnology* 9(15): 2305-2315.

Omar, A.F., A.A. Emeran and J.M. Abass. 2008. Detection of phytoplasma associated with periwinkle virescence in Egypt. *Plant Pathology Journal* 7(1): 92-97.

Purcell, A.H. 1982. Insect vector relationships with procariontic plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 20: 397-417.

Purcell, A.H. 1988. Increased survival of *Dalbulus maidis* DeLong & Wolcott, a specialist on maize on nonhost plants infected with mollicute plant pathogens. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 46:187-196.

Rao, G.P., S. Mall and C. Marcone. 2010. '*Candidatus* Phytoplasma cynodontis' (16SrXIV group) affecting *Oplismenus burmannii* (Retz.) P. Beauv. and *Digitaria sanguinalis* (L.) Scop. in India. *Australasian Plant Disease* 5: 93-95.

SAG, Chile. 2010. Servicio Agrícola y Ganadero. Catastro Vitícola Nacional. Disponible: <http://www.SAG.cl>. Leído el 4 de octubre de 2011.

SAG, Chile. 2012. Servicio Agrícola y Ganadero. Informe Ejecutivo Producción de Vinos 2012. Disponible: <http://www.SAG.cl>. Leído el 10 de junio de 2012.

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

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

Steffek, R., H. Reisenzein and N. Zeisner. 2007. Analysis of pest risk from Grapevine Flavescence dorée phytoplasma to Austrian viticulture. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 37: 191-203.

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

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

Wei, W., R.E. Davis, I.M. Lee and Y. Zhao. 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.

Weintraub, P. and L. Beanland. 2006. Insect vectors of phytoplasmas. *Annual Review of Entomology* 51: 91-111.

Wilson, M.R. and P.G. Weintraub. 2007. An introduction to Auchenorrhyncha phytoplasma vectors. *Bulletin of Insectology* 60: 177-178.

Zhang, Y., J.K. Uyemoto and B.C. Kirkpatrick. 1998. A small-scale procedure for extracting nucleic acids from woody plants infected with various phytopathogenes for PCR assay. *Journal of Virological Methods* 71: 45-50.

ANEXO I

Familias y géneros de vectores de fitoplasmas

Orden: Hemiptera

Suborden: Auchenorrhyncha

• Cicadomorpha

-**Super familia:** Cicadoidea

Cercopoidea

Membracoidea o Cicadelloidea

Familia: Cicadellidae

Subfamilia: Deltocephalinae

Género: *Macrosteles*, *Oriosus*, *Scaphoideus*,
Circulifer, *Dalbulus*, *Deltocephalus*,
Euselidius, *Euscelis*, *Exitanus*, etc

Subfamilia: Agallinae

• Fulgomorpha

-**Super familia:** Fulgoroidae

Familia: Cixiidae

Género: *Cixius*, *Hyalesthes*, *Myndus*, *Oliarius*,
Pentastiridius y *Reptalus*

Delphacidae

Género: *Eumetopina*, *Javesella*, *Nilaparvata*
Saccharosydne.

Derbidae

Género: *Proutista*

Flatidae

Género: *Metcalfa*

Suborden: Sternorrhyncha

-**Super familia:** Psylloidae

Familia: Psyllidae

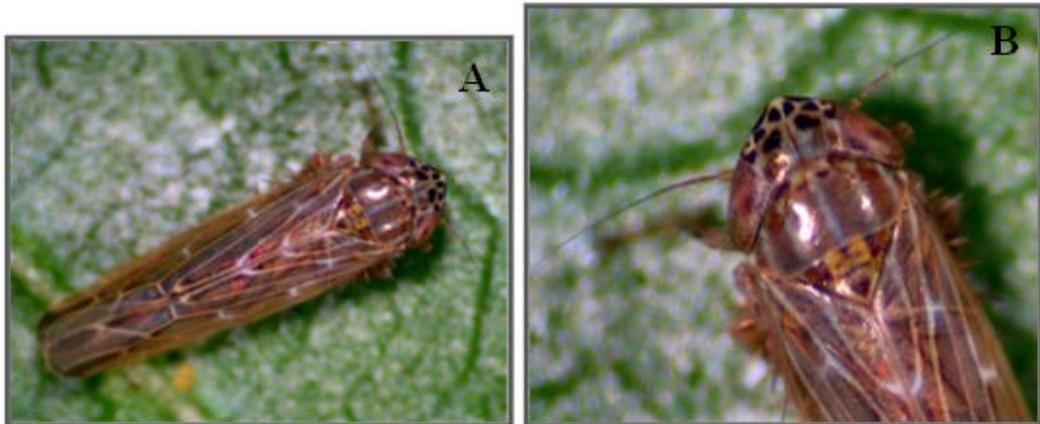
Género: *Cacopsylla* y *Bactericera*

ANEXO II

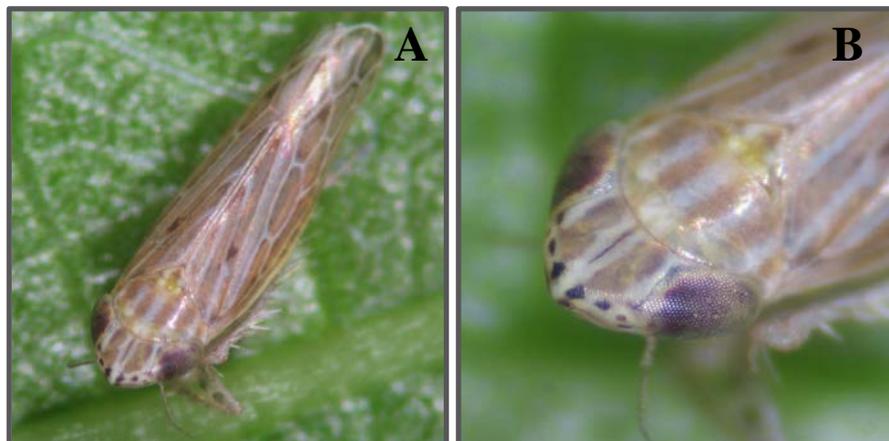
Características morfológicas de *Paratanus exitiosus* (Beamer): A) adulto y B) zona dorsal



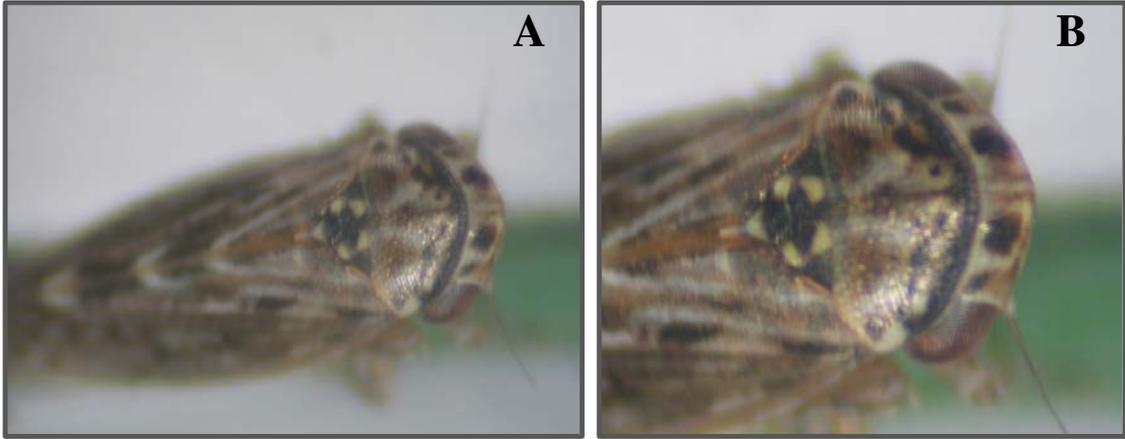
Características morfológicas de *Amplicephalus curtulus* (Linnavuori y De Long): A) adulto y B) zona dorsal



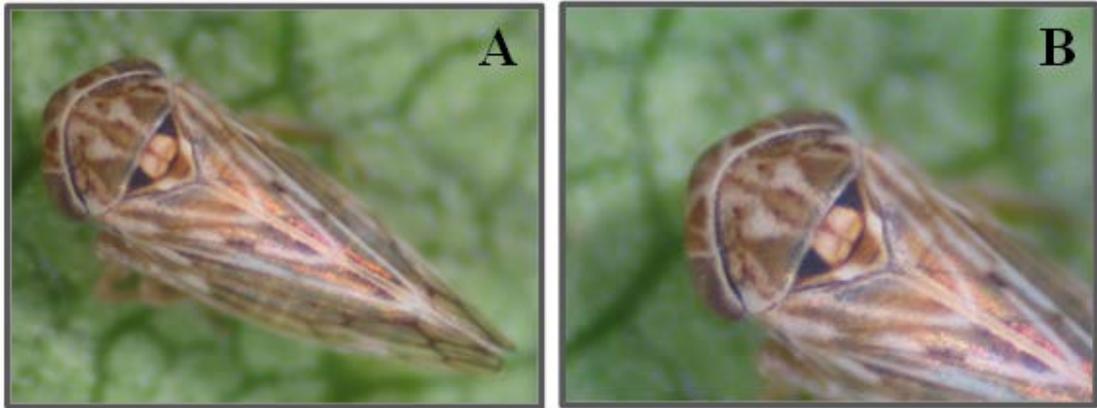
Características morfológicas de *Amplicephalus* sp. : A) adulto y B) zona dorsal



Características morfológicas de *Bergalia valdiviana*: A) adulto y B) zona dorsal



Características morfológicas de *Bergalia* sp.: A) adulto y B) zona dorsal



Características morfológicas de Familia Xerophloea: A) adulto y B) zona dorsal



ANEXO III

Plantas utilizadas en las pruebas de transmisión

Viñedo Buin

	<i>P. exitiosus</i>		<i>A. curtulus</i>	
	Vinca	Vid	Vinca	Vid
Septiembre	Vc 20 A-B-C	Vid 46 A-B-C	-	-
Octubre	Vc 21 A-B-C	Vid 47 A-B-C	Vc 22 A-B-C	Vid 48 A-B-C
Noviembre	Vc 28 A-B-C	Vid 54 A-B-C	-	-
Diciembre	Vc 31 A-B-C	Vid 60 A-B-C	-	-
Enero	Vc 34 A-B-C	Vid 63 A-B-C	-	-
Febrero	Vc 37 A-B-C	Vid 66 A-B-C	-	-
Marzo	Vc 40 A-B-C	Vid 69 A-B-C	-	-
Abril	Vc 43 A-B-C	Vid 73 A-B-C	-	-
Mayo	Vc 47 A-B-C	Vid 78 A-B-C	-	-

Plantas control: Vinca: Vc BU A-B-C

Vid: Vid BU A-B-C

Viñedo Pirque

	<i>P. exitiosus</i>		<i>A. curtulus</i>	
	Vinca	Vid	Vinca	Vid
Septiembre	-	Vid 43 A-B-C	Vc 18 A-B-C	Vid 44 A-B-C
Octubre	Vc 23 A-B-C	Vid 49 A-B-C	Vc 24 A-B-C	Vid 50 A-B-C
Noviembre	Vc 29 A-B-C	Vid 56 A-B-C	-	Vid 57 A-B-C
Diciembre	Vc 32 A-B-C	Vid 61 A-B-C	-	-
Enero	Vc 35 A-B-C	Vid 64 A-B-C	-	-
Febrero	Vc 39 A-B-C	Vid 68 A-B-C	-	-
Marzo	Vc 41 A-B-C	Vid 70 A-B-C	-	-
Abril	-	Vid 75 A-B-C	Vc 44 A-B-C	Vid 74 A-B-C
Mayo	-	Vid 79 A-B-C	Vc 48 A-B-C	Vid 80 A-B-C

Plantas control: Vinca: Vc PI A-B-C

Vid: Vid PI A-B-C

Viñedo Casablanca

	<i>P. exitiosus</i>		<i>A. curtulus</i>	
	Vinca	Vid	Vinca	Vid
Septiembre	-	Vid 41 A-B-C	Vc 17 A-B-C	Vid 42 A-B-C
Octubre	Vc 25 A-B-C	Vid 51 A-B-C	Vc 27 A-B-C	Vid 53 A-B-C
Noviembre	Vc 30 A-B-C	Vid 59 A-B-C	-	Vid 58 A-B-C
Diciembre	Vc 33 A-B-C	Vid 62 A-B-C	-	-
Enero	Vc 36 A-B-C	Vid 65 A-B-C	-	-
Febrero	Vc 38 A-B-C	Vid 67 A-B-C	-	-
Marzo	Vc 42 A-B-C	Vid 71 A-B-C	-	Vid 72 A-B-C
Abril	Vc 45 A-B-C	Vid 76 A-B-C	Vc 46 A-B-C	Vid 77 A-B-C
Mayo	Vc 49 A-B-C	Vid 81 A-B-C	Vc 50 A-B-C	Vid 82 A-B-C

Plantas control: Vinca: Vc CB A-B-C

Vid: Vid CB A-B-C

ANEXO IV

Número de plantas de transmisión con síntomas

Viñedo Buin*. Paratanus exitiosus*

Vinca	20	21	28	31	34	37	40	43	47
Síntoma	0/3	0/3	1/3	1/3	0/3	1/3	0/3	0/3	0/3
Vid	46	47	54	60	63	66	69	73	78
Síntoma	0/3	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	1/3

Nota. Síntoma: numerador plantas con síntomas/ denominador número total de plantas evaluadas.

. Amplicephalus curtulus

Vinca	22
Síntoma	0/3
Vid	48
Síntoma	0/3

Nota. Síntoma: numerador plantas con síntomas/ denominador número total de plantas evaluadas.

. Plantas Control

Vinca	Vc BU
Síntoma	0/3
Vid	Vid BU
Síntoma	0/3

Nota. Síntoma: numerador plantas con síntomas/ denominador número total de plantas evaluadas.

Viñedo Pirque*. Paratanus exitiosus*

Vinca	23	29	32	35	39	41			
Síntoma	1/3	0/3	0/3	1/3	1/3	0/3			
Vid	43	49	56	61	64	68	70	75	79
Síntoma	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3

Nota. Síntoma: numerador plantas con síntomas/ denominador número total de plantas evaluadas.

. Amplicephalus curtulus

Vinca	18	24	44	48	
Síntoma	0/3	0/3	0/3	0/3	
Vid	44	50	57	74	80
Síntoma	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3

Nota. Síntoma: numerador plantas con síntomas/ denominador número total de plantas evaluadas.

. Plantas Control

Vinca	Vc PI
Síntoma	0/3
Vid	Vid PI
Síntoma	0/3

Nota. Síntoma: numerador plantas con síntomas/ denominador número total de plantas evaluadas.

Viñedo Casablanca
. Paratanus exitiosus

Vinca	25	30	33	36	38	42	45	49	
Síntoma	0/3	2/3	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	
Vid	41	51	59	62	65	67	71	76	81
Síntoma	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	1/3	0/3

Nota. Síntoma: numerador plantas con síntomas/ denominador número total de plantas evaluadas.

. Amplicephalus curtulus

Vinca	17	27	46	50		
Síntoma	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
Vid	42	53	58	72	77	82
Síntoma	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3

Nota. Síntoma: numerador plantas con síntomas/ denominador número total de plantas evaluadas.

. Plantas Control

Vinca	Vc CB
Síntoma	0/3
Vid	Vid CB
Síntoma	0/3

Nota. Síntoma: numerador plantas con síntomas/ denominador número total de plantas evaluadas.