

Universidad Aut3noma de Barcelona

Facultad de Ciencias

*Departamento de Biolog3a Animal, Vegetal y Ecolog3a*

**Tesis Doctoral**

**DETECCIÓN, TRANSMISIÓN Y  
CARACTERIZACIÓN DEL FITOPLASMA  
ASOCIADO A LA ENFERMEDAD DEL  
DECAIMIENTO DEL PERAL**

Meritxell Garcia Chapa

2004

Programa de Fisiología vegetal  
Bienio 1999-2002

**DETECCIÓN, TRANSMISIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL  
FITOPLASMA ASOCIADO A LA ENFERMEDAD DEL  
DECAIMIENTO DEL PERAL**

Memoria presentada por  
Meritxell Garcia Chapa  
para optar a la obtención del grado de  
Doctor en Ciencias biológicas

**Directora: Assumpció Batlle i Durany**  
Investigadora  
Dept. de Patología Vegetal  
IRTA-Cabrils

**Tutor: Joan Barceló i Coll**  
Catedrático de la Universidad  
Unidad de Fisiología Vegetal  
Fac. Ciencias. UAB

Barcelona,

Enero de 2004

*Al Xavi, per tot  
Es muss Sein*

## Agradecimientos

Quisiera agradecer a la Dra. Assumpció Batlle (Investigadora del Departamento de Protección Vegetal, IRTA-Cabrils) la dirección del presente trabajo, así como su apoyo, sus consejos y conocimientos.

Al Dr. Barceló i Coll, (Catedrático de la facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Barcelona) por haberme dado la oportunidad de vincularme a la investigación siendo mi tutor.

A Marian Viruel (Investigadora del CSIC de Málaga) por su ayuda en todos los momentos que lo he necesitado.

A Giuseppe Firrao, por haberme enseñado tanto durante mi estancia en Italia, y a la vez por haber sido amigo cuando lo necesitaba.

A Raffaella, Federica, Stefano, Francesca y Pipo, por haberme acogido desde el primer momento en el laboratorio como una más y haberme enseñado las costumbres italianas dentro y fuera del centro

A Jordi Luque, por ser tan comprensivo, guía y a la vez amigo en todo momento.

A Jose Aramburu, por sus consejos y amistad.

A Olga Jurado, por su ayuda en la parte experimental del trabajo y a Jordi Sabaté por estar ahí ayudándome con las psilas y haciéndome reír en cualquier momento.

A los de la casita, Cristina, Sonia, Rafa, Miguel, Esther, Job, Pepa, Marta, Mireia, Enric, por haber pasado tan buenos momentos con ellos, por haber compartido hasta altas horas de la noche este espacio, por haberme animado siempre en los momentos más difíciles, algunos de ellos por haber tenido la paciencia de ayudarme a corregir la tesis, y a todos por haberse convertido en verdaderos amigos.

A todos los del departamento de Protección vegetal, y en especial a Victoria Estaún y Cinta Calvet por pasarse horas corrigiéndome artículos en inglés.

A Rosa Gabarra, por haberme aconsejado siempre que la necesitaba y haberme dado ánimos constantemente y en general a todos los del departamento de Entomología, con quienes me he sentido como una más

A Jordi Ballester y Jordi García, por haberme ayudado en todo momento y a Mónica, M<sup>a</sup> José Gonzalo, Vanesa, Trini y muchos otros por haberme acogido en el Departamento de Genética cuando lo necesitaba.

A Sonia, por darme ánimos para continuar adelante y a todos los de Colera.

A Anna y David, por ser tan especiales.

A Eli, Lidia, Tere, Eve. Ana y Nuria, por estar siempre conmigo.

De la misma forma, quiero expresar mi gratitud a todos aquellos que han estado a mi lado durante todo este tiempo, mis padres, mi hermana, Rashid y todos mis amigos.

Y por último, pero sin dejar de ser el más importante, a Xavi, por su paciencia, ayuda y cariño en todo momento.

Este trabajo se ha podido llevar a cabo gracias a la beca otorgada por la CIRIT 2000FI 00031.

# Índice

<b>1</b>	<b>Introducción</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>El peral</b>	
1.1.1	Origen	1
1.1.2	Taxonomía y morfología de <i>Pyrus communis</i>	1
1.1.3	Importancia económica	2
1.1.4	Aspectos biológicos del género <i>Pyrus</i>	3
1.1.4.1	<u>Periodos del peral</u>	3
1.1.4.2	<u>Ciclos fisiológicos</u>	4
1.1.5	Condiciones edafoclimáticas	4
1.1.6	Propagación.	5
1.1.6.1	<u>Franco</u>	5
1.1.6.2	<u>Membrillero</u>	6
1.1.7	Variedades de peral	6
1.1.7.1	<u>Limonera</u>	6
1.1.7.2	<u>Blanquilla</u>	7
1.1.7.3	<u>Williams</u>	7
1.1.7.3	<u>Bartlett</u>	7
1.1.8	Plagas y enfermedades del peral	7
<b>1.2</b>	<b>Los fitoplasmas</b>	<b>8</b>
1.2.1	Origen	8
1.2.2	Clasificación y características	8
1.2.2.1	<u>Mollicutes. Clasificación y características</u>	9
1.2.2.2	<u>Justificación de la pertenencia de los fitoplasmas a la clase Mollicutes</u>	10
1.2.2.3	<u>Características específicas de los fitoplasmas.</u>	11
1.2.2.4	<u>Clasificación de los fitoplasmas</u>	12
A-	El gen 16S rDNA	12
B-	Clasificación de los fitoplasmas	12
1.2.3	Caracterización molecular de los fitoplasmas	13
1.2.4	Huéspedes de los fitoplasmas	13
1.2.5	Sintomatología	14
1.2.6	Medidas de control.	16
<b>1.3</b>	<b>El Decaimiento del peral o Pear decline (PD)</b>	<b>16</b>
1.3.1	Origen	16
1.3.2	Distribución geográfica	17
1.3.3	Sintomatología de la enfermedad del Decaimiento del peral (PD)	17
1.3.3.1	<u>Decaimiento Lento o “Slow Decline”</u>	18
1.3.3.2	<u>Decaimiento rápido o “Quick decline”</u>	18
1.3.4	Distribución del fitoplasma en el árbol	19
1.3.5	El vector del fitoplasma causante del Decaimiento del peral: los psílicos.	21
1.3.6	Detección del fitoplasma de PD	22
<b>1.4</b>	<b>Objetivos generales</b>	<b>25</b>
<b>1.5</b>	<b>Bibliografía</b>	<b>26</b>

## **2 Incidencia, expresión de síntomas y caracterización del fitoplasma asociado a la enfermedad del Decaimiento del peral en Cataluña.**

---

<b>2.1</b>	<b>Introducción</b>	<b>35</b>
<b>2.2</b>	<b>Material y métodos</b>	<b>36</b>
2.2.1	Extensión de la enfermedad de PD en el Nordeste de España	36
2.2.2	Incidencia de la enfermedad de PD en distintas variedades de peral afectadas	36
2.2.2.1	<i>Detección del fitoplasma</i>	36
2.2.3	Caracterización del fitoplasma asociado a la enfermedad de PD en diferentes parcelas del Nordeste de España	38
2.2.4	Expresión de síntomas de PD en 3 variedades distintas de peral: Bartlett, Limonera y Blanquilla.	38
<b>2.3</b>	<b>Resultados</b>	<b>39</b>
2.3.1	Extensión de la enfermedad de PD en el Nordeste de España	39
2.3.2	Incidencia de la enfermedad de PD (PDI)	40
2.3.3	Expresión de síntomas en 3 variedades distintas de peral: Bartlett, Limonera y Blanquilla.	41
2.3.4	Caracterización del fitoplasma asociado a la enfermedad de PD en diferentes parcelas del Nordeste de España.	44
<b>2.4</b>	<b>Discusión</b>	<b>46</b>
<b>2.5</b>	<b>Bibliografía</b>	<b>48</b>

## **3 Detección estacional del fitoplasma del Decaimiento del peral mediante nested-PCR, en tres variedades distintas de peral.**

---

<b>3.1</b>	<b>Introducción</b>	<b>52</b>
<b>3.2</b>	<b>Material y Métodos</b>	<b>53</b>
3.2.1	Detección estacional del fitoplasma de PD mediante PCR en tres variedades distintas de peral	53
3.2.1.1	Material vegetal	53
3.2.1.2	Detección del fitoplasma	53
3.2.1.3	<i>Tratamiento estadístico</i>	54
3.2.2	Correlación entre expresión de síntomas y detección por PCR	54
3.2.3	Transmisión del fitoplasma de PD mediante injerto de yemas infectadas a perales sanos durante el invierno	55
<b>3.3</b>	<b>Resultados</b>	<b>55</b>
3.3.1	Detección del fitoplasma de PD a lo largo del año	55
3.3.2	Estudio de la detección de PD en diferentes partes de la planta	60
3.3.3	Correlación entre expresión de síntomas y detección por PCR	64
3.3.4	Transmisión del fitoplasma de PD mediante injerto de yemas infectadas a perales sanos durante el invierno	66
<b>3.4</b>	<b>Discusión</b>	<b>66</b>

## **4 Estudio de la transmisión del fitoplasma del Decaimiento del peral en España por *Cacopsylla pyri*. Influencia del sexo del insecto en la adquisición y transmisión del fitoplasma. 73**

<b>4.1</b>	<b>Introducción</b>	<b>74</b>
<b>4.2</b>	<b>Material y métodos</b>	<b>75</b>
4.2.1	Localización y características de la parcela utilizada en este estudio	75
4.2.2	Transmisión del fitoplasma de PD por <i>C. pyri</i> a perales sanos	75
4.2.3	Adquisición del fitoplasma de PD por <i>C. pyri</i> y transmisión a un medio nutritivo	76
4.2.4	Detección del fitoplasma de PD en insectos y medio nutritivo	76
4.2.4.1	<u>Extracción de ADN</u>	76
4.2.4.2	<u>Amplificación por PCR</u>	77
4.2.5	Análisis estadístico	77
<b>4.3</b>	<b>Resultados</b>	<b>78</b>
4.3.1	Incidencia del fitoplasma de PD en la parcela estudiada	78
4.3.2	Transmisión del fitoplasma de PD por <i>C. pyri</i> a perales sanos	79
4.3.3	Adquisición del fitoplasma de PD por <i>C. pyri</i> en una parcela de peral variedad Williams	79
4.3.4	Sex ratio de la población adulta de <i>C. pyri</i>	82
4.3.5	Adquisición del fitoplasma según el sexo de <i>C. pyri</i>	82
4.3.6	Transmisión del fitoplasma de PD a un medio nutritivo rico en azúcares según el género de <i>C. pyri</i>	83
<b>4.4</b>	<b>Discusión</b>	<b>86</b>
<b>4.5</b>	<b>Bibliografía</b>	<b>88</b>

## **5 Clonación y estudio del genoma del fitoplasma del Decaimiento del peral 92**

<b>5.1</b>	<b>Introducción</b>	<b>93</b>
<b>5.2</b>	<b>Material y métodos</b>	<b>94</b>
5.2.1	Distribución teórica de las longitudes de los fragmentos de ADN de los genomas de <i>Mycoplasma pulmonis</i> y <i>Arabidopsis thaliana</i> , tras la digestión con la enzima de restricción <i>AseI</i>	94
5.2.2	Material vegetal	94
5.2.3	Extracción de ácidos nucleicos y tratamiento con RNAasa	94
5.2.4	Separación del ADN fitoplasmático por centrifugación en gradiente de CICs y en presencia de bisbenzimidida.	94
5.2.5	PCR competitiva	95
5.2.6	Preparación del ADN del fitoplasma	95
5.2.6.1	<u>Digestión del ADN</u>	95
5.2.6.2	<u>Preparación de los adaptadores y condiciones de ligación</u>	96
5.2.6.3	<u>Amplificación de los fragmentos de ADN</u>	96

5.2.7 Clonación de los productos de PCR	96
5.2.8 Hibridación mediante la técnica de dot.blot para la selección de los clones con ADN fitoplasmático	97
5.2.8.1 Hibridación directa	97
5.2.8.2 Hibridación inversa	97
5.2.9 Secuenciación	98
5.2.10 Síntesis de cebadores de las secuencias obtenidas	98
<b>5.3 Resultados</b>	<b>99</b>
5.3.1 Distribución teórica de las longitudes de los fragmentos de ADN de los genomas de <i>Mycoplasma pulmonis</i> y <i>Arabidopsis thaliana</i> tras la digestión con la enzima de restricción <i>AseI</i>	99
5.3.2 Separación del ADN fitoplasmático por centrifugación en gradiente de CICs y en presencia de bisbenzimidida	100
5.3.3 Amplificación del ADN y clonación	101
5.3.4 Análisis por hibridación de las colonias recombinantes	102
5.3.4.1 Hibridación directa	102
5.3.4.2 Hibridación inversa	102
5.3.5 Análisis de la secuenciación	102
5.3.6 Síntesis de cebadores de las secuencias obtenidas	105
<b>5.4 Discusión</b>	<b>107</b>
<b>5.5 Bibliografía</b>	<b>110</b>
<b>6 Evaluación de la especificidad de algunos de los fragmentos de ADN clonados del fitoplasma del Decaimiento del peral, mediante dot.blot y PCR.</b>	<b>115</b>
<b>6.1 Introducción</b>	<b>116</b>
<b>6.2 Material y Métodos</b>	<b>117</b>
6.2.1 Puesta a punto de la detección por hibridación de ácidos nucleicos o dot.blot, con dos sondas no ribosómicas, obtenidas a partir de los fragmentos 7 y 14 del genoma de PD	117
6.2.1.1 Material	117
6.2.2.2 Extraóccin de ácidos nucleicos	117
6.2.2.3 Detección del fitoplasma de PD: Preparación de las sondas e hibridación por dot.blot	117
6.2.2 Comparación de la sensibilidad de las técnicas de nested-PCR y dot.blot en la detección del fitoplasma de PD, en <i>C. pyri</i> .	118
6.2.3 Detección del fitoplasma de PD por PCR, con cebadores no ribosómicos, y análisis de su especificidad.	118
6.2.3.1 Material vegetal	118
6.2.3.2 Detección de fitoplasmas	119
<b>6.3 Resultados</b>	<b>119</b>
6.3.1 Puesta a punto de la detección por hibridación de ácidos nucleicos o dot.blot, con dos sondas no ribosómicas, obtenidas a partir de los fragmentos 7 y 14 del genoma del PD	119
6.3.2 Comparación de la sensibilidad de las técnicas de nested-PCR y dot.blot en la detección del fitoplasma de PD en <i>C. pyri</i> .	120

6.3.3 Detección del fitoplasma de PD por PCR con cebadores no ribosómicos, y análisis de su especificidad.	121
6.4 Discusión	122
6.5 Bibliografía	124
<b>7 Conclusiones generales</b>	<b>127</b>
<b>8 Anexos</b>	<b>130</b>

## Relación de abreviaciones

**A:** Adenina

**ACLR:** Fitoplasma del enrollamiento clorótico del albaricoquero o “Apple Chlorotic leaf roll”

**ACLSV:** Virus de la mancha clorótica de la hoja del manzano o *Apple chlorotic leaf spot virus*

**APSGV:** Virus de la madera asurcada del manzano o *Apple stem grooving virus*

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**ADNt:** Ácido desoxirribonucleico de transferencia

**AFLP:** Polimorfismos en fragmentos amplificados o “Amplified Fragment Length Polymorphism”

**AP:** El fitoplasma de la Proliferación del manzano o “Apple proliferation”

**ARN:** Ácido ribonucleico

**ASPV:** Virus de las depresiones de la madera del manzano o *Apple stem pitting*

**AY:** Fitoplasma del Amarilleo del aster o “Aster yellows”

**Blast:** “Basic Local Alignment Search Tool”

**BN:** Fitoplasma de la madera negra de la vid o “Bois noir”

**BP:** Pares de bases

**BSA:** Albúmina sérica bovina

**C:** Citosina

**Cl<sub>2</sub>Mg:** Cloruro de magnesio

**CP:** El fitoplasma de la Filodia del trébol o “Clover phyllody”

**CsCl:** Cloruro de cesio

**CSPD:** “Chemiluminescent Substrate for Alkaline Phosphatase”

**CTAB:** Bromuro de cetil-trimetil-amonio

**DAPI:** 4',6'-Diamidino-2 fenilindol

**dNTP:** Desoxirribonucleótido trifosfato

**EDTA:** Ácido Etilen-DiaminoTetracético

**ELISA:** “Enzyme linked immunosorbent assay”

**ESFY:** Fitoplasma de los amarillos en frutales de hueso o “European stone fruit yellows”

**FAO:** Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación o “Food and Agriculture Organization of the United Nations”

**FBP:** Fitoplasma de la filodia del haba o “Faba bean phyllody”

**FD:** Flavesencia dorada o “Flavescence dorée”

**G:** Guanina

**GSFY:** Fitoplasma del amarilleo de los frutales de hueso alemán o “German stone fruit yellows”

**GVX:** Fitoplasma de la enfermedad X de Green Valley o “Green valley X disease”

**HCl:** Ácido clorhídrico

**IPTG:** Isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido

**KCl:** Cloruro de potasio

**LB:** Medio Luria-Bertani

**MLO:** “Mycoplasmalike organism”

**NaCl:** Cloruro de sodio

**NCBI:** “The National Center for Biotechnology Information”

**OAY:** Fitoplasma del amarilleo de la Oenothera o “Oenothera aster yellows”

**OHF:** “Old Home x Farmingdale”

**PCR** Reacción en cadena de la Polimerasa o “Polimerasa chain reaction”

**PFGE:** Electroforesis en campo pulsante o “Pulse field gel electrophoresis”

**PGB:** Tampón de homogeneización para extracción de fitoplasmas o “Phytoplasma Grinding Buffer”

**PVP:** Polivinil pirrolidona

**PYLR:** Fitoplasma del enrollamiento clorótico del melocotonero o “Peach yellow leaf roll”

**RAPDs:** ADN polimórfico amplificado al azar o “Random amplified polymorphic DNA markers”

**RFLP:** Polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción o “Restriction fragment length polymorphism”

**SDS:** Lauril sulfato de sodio

**SSC:** Tampón citrato sódico salino

**SWLP:** Fitoplasma de la hoja blanca de la caña de azúcar o “Sugarcane white leaf phytoplasma”

**T:** Timina

**TAE:** Tampón Tris-Acetato-EDTA

**TWB:** Fitoplasma de las escobas de bruja de Tagetes o “Tagetes witches broom”

**ULW:** Fitoplasma de las escobas de bruja del olmo o “Ulmus witches’ broom”

**UTP:** Uridin-trifosfato

**X-Gal:** 5-Bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactopiranosido

# 1

## Introducción general

### 1.1 El peral

#### 1.1.1 Origen

El cultivo del peral data de hace unos 3000 años. Su origen se localiza en el oeste de Asia, aunque escritos de Homero (700 aC) sugieren una posible procedencia europea. En China, la primera especie domesticada fue *Pyrus pyrifolia*, peral silvestre que producía frutos comestibles sin necesidad de una selección previa. Posteriormente, se realizaron hibridaciones entre *P. ussuriensis* y *P. pyrifolia*. En occidente, *P. communis* var *pyraster* y *P. communis* var. *caucásica* fueron seguramente los ancestros del peral Europeo (Lombard & Westwood, 1987).

El género *Pyrus*, incluye 22 especies divididas en occidentales y orientales según su situación geográfica. Las más utilizadas son *P. betulifolia*, *P. calleryana*, *P. pyrifolia* y *P. ussuriensis* como orientales, y *P. communis*, *P. communis* var. *pyraster*, *P. amygdaliformis*, y *P. salicifolia* del grupo de especies occidentales.

#### 1.1.2 Taxonomía y morfología de *Pyrus communis*

*P. communis* pertenece a la subdivisión Angiosperma; Clase Dicotiledónea de hoja caduca; subclase Rosidae, orden Rosales, familia Rosácea y género *Pyrus*. Es un árbol piramidal, que puede alcanzar los 20 metros de altura. Tiene una vida media de 65 años. Su tronco es alto, grueso, de corteza agrietada y gris. Las ramas se insertan formando un ángulo de 45° con el tronco; son de corteza lisa, primero verde y luego gris-violácea con numerosas lenticelas.

Sus hojas son ovales, finamente dentadas o enteras, coriáceas, glabras, algo lustrosas por el haz y con un pecíolo de igual longitud que la lámina o más corto. Las flores tienen largos cabillos y forman unos corimbos umbeliformes en la terminación de las ramillas.

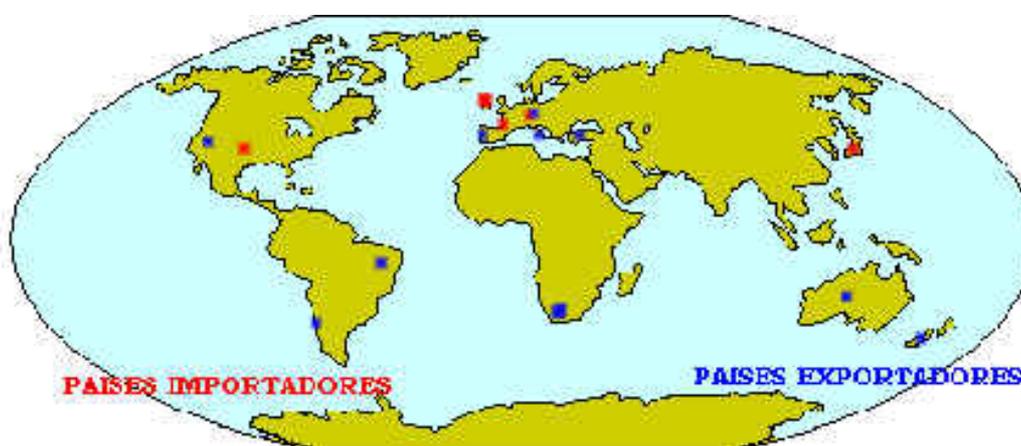
Tienen un ovario ínfero de color blanco o blanco-rosado, y el cáliz está formado por 5 sépalos lanceolados, estrechados en punta. Los pétalos miden generalmente 12-15 mm y son obovados y libres.

El fruto es en pomo, estrechado en la base, con sépalos marcescentes en el ápice umbilicado. En el interior está dividido en cinco celdillas, cada una con 1-2 semillas de cubierta exterior lisa o algo mucilaginosa. La piel del fruto es más o menos lisa, de color verde, tomando un color pardo o amarillento al madurar. Su pulpa es dura, en un inicio ácida que con la madurez pasa a ser blanda y dulce.

*P. communis* tiene unas raíces profundas, con el eje central muy desarrollado, que le permite tener un buen anclaje y ser resistente a la sequía.

### 1.1.3 Importancia económica

La producción mundial de pera supone en la actualidad unos 16 millones de toneladas anuales según datos de la F.A.O. del año 1999. Por continentes, Asia y Europa son los más productivos. China, en estos momentos aporta un 50% de la producción mundial, los EEUU un 6% e Italia un 5% (primer productor europeo).



**Figura 1.1-** Importación y exportación mundial de pera.

España, con algo más de un 4% de la producción mundial, tiene una superficie dedicada al cultivo del peral de aproximadamente unas 40.400 Ha, con una producción de 719.500 toneladas en el año 2001. En el año 2000 exportó 175.031 toneladas de peras y membrillo frente a 44.249 importadas (Anuario de Estadística Agroalimentaria, 2001).

Cataluña en estos momentos es la comunidad con más superficie dedicada a este cultivo, con 18.241 Ha y con una producción de 377.646 toneladas.



**Figura 1.2-** Distribución global de la producción de peras en España

#### **1.1.4 Aspectos biológicos del género *Pyrus***

Con una longevidad superior a los 60 años si las condiciones para su desarrollo son óptimas, presenta distintos periodos y ciclos.

##### 1.1.4.1 Periodos del peral.

- Periodo juvenil o vegetativo: no hay productividad
- Periodo de equilibrio fisiológico: hay una productividad estacionaria
- Periodo de senescencia: disminuye la productividad

#### 1.1.4.2 Ciclos fisiológicos

Podemos distinguir 2 ciclos; el vegetativo y el de fructificación.

*1-Ciclo vegetativo:* se da en los 3 periodos, es anual y se diferencian 3 fases reguladas por hormonas:

- \* Crecimiento de los brotes (de Abril hasta Junio)
- \* Elaboración (de Julio hasta la caída de las hojas, en Diciembre)
- \* Reposo (desde la caída de las hojas en Diciembre hasta Abril)

*2- Ciclo de fructificación:* se produce en el segundo y tercer periodo. Abarca el tiempo comprendido entre los veranos de dos años consecutivos.

Durante el primer año, al inicio del verano, se forman las yemas indiferenciadas. En el interior de éstas, se pueden empezar a diferenciar los órganos florales, que irán desarrollándose hasta formar el cáliz, pétalos, estambres y pistilo. En el segundo año, pasado el invierno, se forman los granos de polen y los óvulos. Durante el mes de Marzo estas yemas comienzan a abrirse, dando lugar a las flores, listas para la fecundación. La fecundación comprende, en primer lugar, la polinización y a continuación, la fusión del núcleo espermático del polen con el núcleo femenino. Una de las características principales de las flores del peral es que, a pesar de ser hermafroditas, no se pueden autofecundar a sí mismas, es decir, existe autoesterilidad. Cuando el polen de una flor encuentra a otra flor receptiva de otra variedad, se puede dar la fecundación y formación del fruto. En algunos casos los frutos se pueden desarrollar y alcanzar la madurez en ausencia de fecundación (partenocarpia).

Los perales producidos por semilla, empiezan a fructificar después de muchos años, mientras que si la propagación se ha realizado por injerto de yemas o enraizamiento de estaquillas, el periodo vegetativo o juvenil suele ser más corto.

#### **1.1.5 Condiciones edafoclimáticas**

El peral prefiere los climas fresco-templados. Requiere cerca de 900-1000 horas de frío, por debajo de 7,2°C, para salir del reposo invernal, por tanto, los ambientes demasiado cálidos o moderados no le son favorables ya que no le permiten completar el periodo de reposo fisiológico necesario.

Florece a 7°C y resiste temperaturas de -18°C a -20°C o incluso de hasta a -40°C en pleno reposo invernal. En primavera esta capacidad va disminuyendo, pudiendo ser muy peligrosas las heladas tardías (afectan a yemas y flores abiertas).

Respecto al terreno más apropiado, el peral se adapta a las diferentes condiciones del terreno si se ha utilizado el portainjerto más apropiado, aunque sólo prospera bien en las tierras limosas y silíceo-arcillosas y permeables. Requiere suelos homogéneos y profundos, ni demasiado secos ni demasiado húmedos. Le es perjudicial un suelo con humedad estancada. Los suelos demasiado secos en verano tampoco le permiten desarrollarse de forma normal, pudiendo llegar a formarse masas esclerosas en la pulpa del fruto.

Cuando el peral se encuentra injertado sobre membrillero, el suelo idóneo es aquel con pH 6,5-7,5, cal activa menor del 7%, con profundidad mínima de 50 cm y sin salinidad. Si el peral está injertado en peral franco (*P. communis*), el pH puede alcanzar 8,2-8,3 y la cal activa el 11-12%.

### **1.1.6 Propagación.**

La multiplicación se realiza mediante injerto o por semilla, ésta última utilizada básicamente para obtener nuevas variedades o patrones de injerto.

### **Porta injertos**

La colección actual de portainjertos es bastante limitada. Básicamente se utilizan dos patrones, el membrillero o *Cydonia* de multiplicación vegetativa, y el peral o *Pyrus* de multiplicación vegetativa o por semilla. El uso de uno u otro dependerá básicamente de si la variedad a injertar es compatible o no con el membrillero, del tipo de suelo, o del país en cuestión, puesto que en Centro Europa suele utilizarse *P. communis*.

#### 1.1.6.1 Franco (*Pyrus sp.*)

Tiene una elevada vigorosidad pero la entrada en producción es lenta. Los patrones francos de peral son heterogéneos si proceden de semilla, y de gran desarrollo, dificultando la poda y la cosecha. Existen selecciones de *P. communis* que se propagan vegetativamente, como los OHF, algunos de ellos mencionados por presentar cierta tolerancia a determinadas enfermedades graves como el fuego bacteriano y el decaimiento

del peral. Sobre este patrón, los frutos son de menor calibre, pero es compatible con todas las variedades de peral.

Tiene un sistema radicular de gran potencia, pivotante y muy profundo, lo cual permite un buen anclaje, resistencia a asfixia en suelos húmedos, y tolerancia a la sequía. Es tolerante frente a la clorosis férrica y resistente a la caliza.

En Europa y América se usa principalmente como patrón *P. communis*, aunque en zonas como el norte de China y regiones centrales se usa *P. betulaefolia*.

#### 1.1.6.2 Membrillero (*Cydonia oblonga*)

Da menor vigorosidad que el peral franco pero con una entrada en producción más rápida, mejor calibre y calidad de la fruta. Tiene un sistema de raíces fasciculado y un buen comportamiento frente a la asfixia radicular, pero sensible a la clorosis férrica (Dalmau & Iglesias, 1999).

Este patrón presenta un alto grado de incompatibilidad con muchas de las variedades de peral más utilizadas, entre ellas Limonera, Williams, Magallón, Castells, Condesa, etc. Para evitar los problemas de incompatibilidad se utilizan variedades intermediarias entre el patrón y la variedad a cultivar, como Mantecosa Hardy y Decana de Comice principalmente, aunque Blanquilla también suele dar buenos resultados.

### **1.1.7 Variedades de peral**

En España el número de variedades que se cultivan es limitado, y solamente tres (Blanquilla, Limonera y Conference) representan más del 60% de la superficie, situación análoga a la que se produce en países como Italia, Francia o Bélgica. Aún y así, en las últimas décadas, los principales programas dedicados a mejora genética han obtenido nuevas variedades resistentes a determinados patógenos, que en un futuro podrían ser utilizadas en cultivo. Las variedades que se han utilizado en este proyecto son:

#### 1.1.7.1 Limonera o Dr. Jules Guyot

De origen francés. Fue obtenida hacia el año 1870. Es una variedad muy utilizada en Cataluña (la segunda después de Blanquilla), aunque su distribución ha ido disminuyendo desde el año 1985. Destaca por una producción regular, incluso en épocas de heladas, lo que da a entender su capacidad de adaptación a la mayoría de las zonas fruteras. Se suele

injertar en membrillero para adelantar la recolección y obtener frutos de mayor calibre, aunque en este caso, es recomendable la utilización de intermediarios. Es de vigor moderado y tiene una entrada en producción rápida y elevada. Su época de floración es tardía. Tiene aptitudes partenocárpicas, aunque la forma y la calidad del fruto, mejoran con polinizadores. Sus mejores polinizadores son Conference, Williams, Mantecosa Hardy y General Leclerc.

#### 1.1.7.2 Blanquilla

Probablemente de origen español. Es una de las variedades más utilizadas en Cataluña, con una expansión continua en estos últimos años, debido a que puede producir frutos por partenocarpia y a su elevada productividad. Es un árbol muy vigoroso, pero su entrada en producción es lenta. Su compatibilidad con el portainjerto membrillero es mediana, sin que sea necesario el uso de intermediarios. Como polinizadores acepta a Castells, Ercolini, Magallón y Canyella.

#### 1.1.7.3 Williams

De origen inglés. Es la variedad más cultivada en Occidente, ya que tiene una elevada productividad y calidad gustativa. Se puede injertar sobre pie franco o membrillero, aunque en el segundo caso, es necesario el uso de un intermediario.

#### 1.1.7.4 Bartlett

Es originaria de Estados Unidos (1938). Proviene de una mutación de la variedad Williams, por lo que presenta unas características similares, pero con menor vigor y menor compatibilidad con membrillero. La recolección también es posterior. Es una variedad con aptitud partenocárpica. Como polinizadores se utilizan Conference, Decana de Comice, Limonera y General Leclerc.

### **1.1.8 Plagas y enfermedades del peral**

Existen diferentes patógenos que producen enfermedades en el peral, entre ellos hongos, bacterias, virus y el fitoplasma del Decaimiento del peral. Las enfermedades producidas por hongos y bacterias son las más conocidas y estudiadas, mientras que las

producidas por virus y fitoplasmas, son de difícil diagnóstico, tanto por las técnicas que existen en la actualidad para detectarlos, como por la sintomatología que producen, ya que pueden confundirse con otras causas no parasitarias.

El peral también está afectado por diversas plagas. En el anexo nº 1 se detallan las principales plagas y enfermedades que afectan al peral.

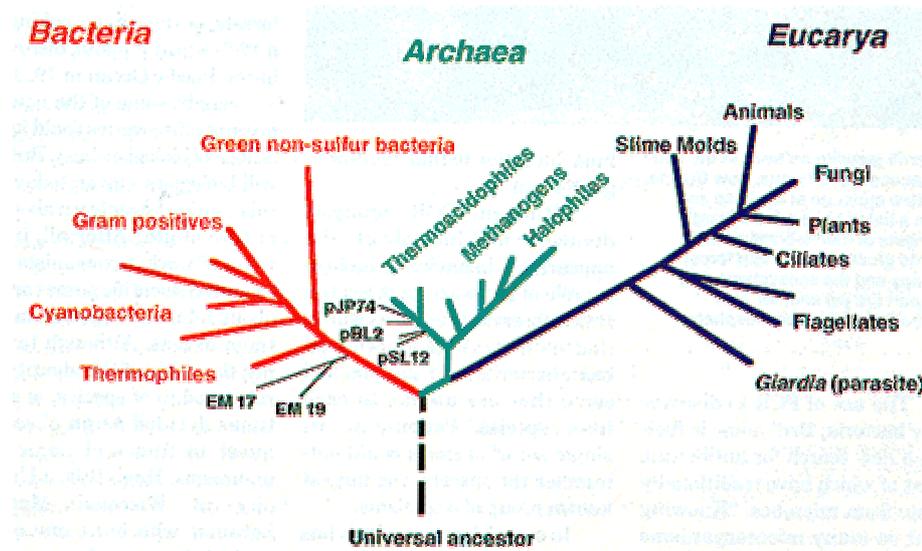
## 1.2 Los fitoplasmas

### 1.2.1 Origen

Se conocen desde hace unas 3 décadas. En 1967 gracias a la microscopía electrónica se determinó que algunas de las enfermedades llamadas “yellow diseases” eran producidas por células procariotas y no por virus, como se presumía hasta entonces (Doi *et al.*, 1967). El descubrimiento de estos organismos parecidos a los micoplasmas, causantes de enfermedades animales, originó el inicio de un estudio exhaustivo y la búsqueda de su parentesco con el resto de microorganismos. En un inicio se les llamó mycoplasma-like organisms o MLO. En el año 1994, el Comité de Taxonomía de los Mollicutes de la IOM (International Organization for Mycoplasma) estableció el nombre actual de fitoplasma. Recientemente ha sido propuesto el término fitoplasma como candidato a género “*Candidatus phytoplasma*” (The IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team, 2003) Phytoplasma taxonomy group (2003).

### 1.2.2 Clasificación y características

En un inicio, los seres vivos se clasificaban en 5 reinos (Whittaker, 1969). Sin embargo, Woese y sus colaboradores, mediante la comparación de los genes ribosómicos, presentaron un modelo filogenético que revolucionó los esquemas taxonómicos establecidos hasta el momento. Los seres vivos pasaron a clasificarse en tres dominios: **Bacteria (o Eubacteria)**, **Archae** y **Eucarya** (Woese *et al.*, 1990).



**Figura 1.3-** Clasificación de los seres vivos en tres dominios según el modelo filogenético basado en las secuencias del gen ribosómico descrito por Woese *et al.*, (1990)

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

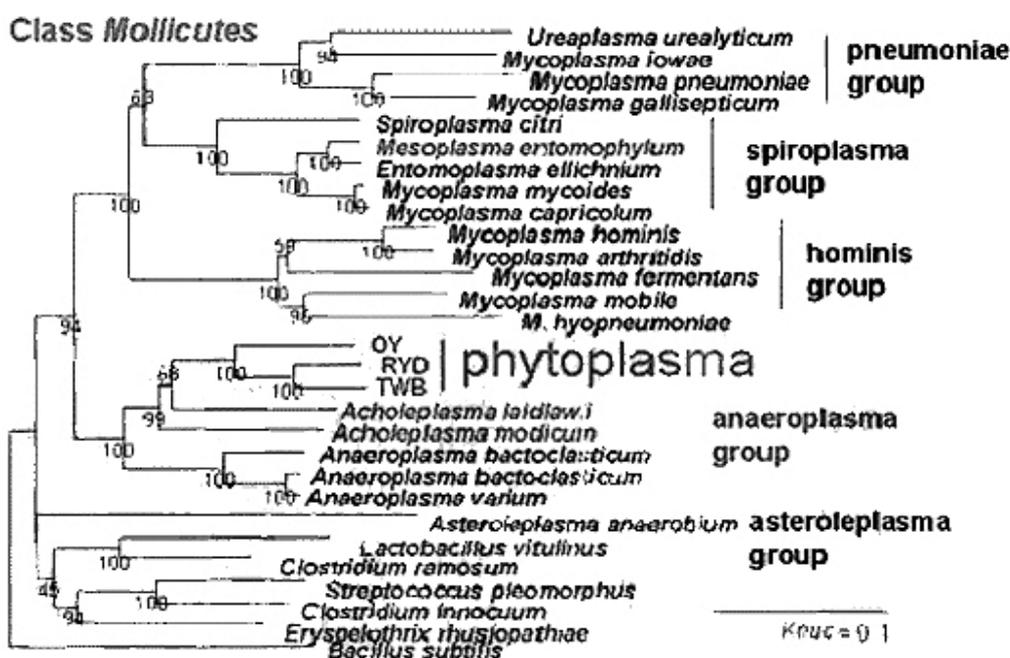
Reino: Eubacteria

Phyllum: Tenericutes

Clase : Mollicutes.

1.2.2.1 Mollicutes. Clasificación y características

Clasificación de los Mollicutes



El término Mollicute comporta una serie de características como:

- Ausencia de pared celular, y por tanto resistentes a la penicilina y sensibles a la tetraciclina y derivados (Tully, 1989).
- Pleomorfismo
- Capacidad de pasar a través de poros de 450 nm
- Genoma de pequeño tamaño
- Parasitos, comensales y saprófitos de animales y plantas

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

#### 1.2.2.2 Justificación de la pertenencia de los fitoplasmas a la clase Mollicutes

A partir del año 1989 empiezan a hacerse estudios que clarifican la pertenencia de los fitoplasmas a la clase Mollicutes.

- Los genomas de los MLO o fitoplasmas contienen entre un 25 y un 32 % de G+C (Kollar *et al.*, 1989; Sears *et al.*, 1989) y tienen entre 640 y 1185 Kb (Neimark & Kirkpatrick, 1993; Lauer & Seemüller, 2000; Padovan *et al.*, 2000), valores similares a la de los micoplasmas que se están cultivando.
- Comparando las secuencias ribosómicas del 16S rDNA de dos MLOs pertenecientes al actual grupo de los AY (Lim & Sears, 1989; Kuske & Kirkpatrick, 1992) con otros procariontes, se demuestra que los MLO están emparentados filogenéticamente con los Mollicutes, y dentro de esta clase, sus secuencias ribosómicas tendrían más homología con *Acholeplasma laidlawii*, del Orden Acholeplasmatales que con otros micoplasmas como *Mycoplasma capricolum*, del Orden Mycoplasmatales (Lim & Sears, 1992 a).

Otros estudios que corroboran su parentesco con el orden Acholeplasmatal son:

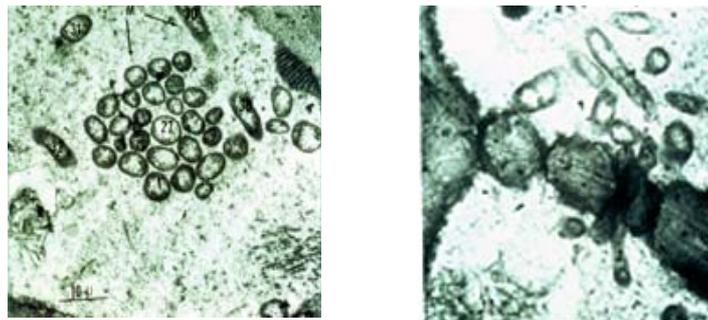
- Los MLO, al igual que *A. laidlawii*, utilizan UGA como codón de terminación, y por tanto se diferencian de *M. capricolum* del orden Mycoplasmatal (Lim & Sears, 1992 a).
- Las características de la membrana del MLO, AOY, cuando se cultivan en ausencia de esterol son más cercanas a *A. laidlawii*, que a la de *M. gallisepticum* (Lim & Sears, 1992b).

### 1.2.2.3 Características específicas de los fitoplasmas.

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

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

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



**Figura 1.4-** Enfermedad X del melocotonero (WX), fitoplasmas en tubos cribosos.

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

#### 1.2.2.4 Clasificación de los fitoplasmas

##### **A- El gen 16S rDNA**

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

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

##### **B-Clasificación de los fitoplasmas**

Actualmente, mediante la amplificación de segmentos del gen 16S rDNA por PCR y RFLP, se han clasificado los fitoplasmas en 20 grupos (Seemüller *et al.*, 1998), o en 14 grupos (Lee *et al.*, 1998). Sin embargo, este gen parece no tener suficiente variabilidad como para permitir diferenciar aislados que, siendo clasificados como el mismo fitoplasma, difieren en la planta o en los insectos que lo hospedan.

En el anexo 2 se encuentra la clasificación de los fitoplasmas según Lee *et al.*, (1998) en base a las diferencias encontradas en el gen 16S rDNA.

### **1.2.3 Caracterización molecular de los fitoplasmas**

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

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

Actualmente se está abordando el estudio de genes diferentes al 16s rRNA para la comprensión de la biología de los fitoplasmas (Oshma *et al.*, 2002; Liefting & Kirkpatrick, 2003), y con el estudio de la genómica, también se espera dar respuesta a cuales son las condiciones necesarias para su cultivo, así como los factores que intervienen en la especificidad vector / planta. Hasta el momento, se han aislado genes que codifican para proteínas de membrana de diferentes fitoplasmas, a partir de los cuales se han desarrollado sueros monoclonales y policlonales (Yu *et al.*, 1998; Berg *et al.*, 1999; Blomquist *et al.*, 2001; Mergenthaler *et al.*, 2001, Morton *et al.*, 2003). Estas proteínas de membrana, al igual que en otros Mollicutes, podrían estar implicadas en el reconocimiento específico del huésped y patogénesis (Wise *et al.*, 1992; Ye *et al.*, 1997; Berg *et al.*, 2000)

#### **1.2.4 Huéspedes de los fitoplasmas**

Los fitoplasmas, como parásitos estrictos, sólo viven en las plantas y en sus insectos vectores. Éstos se pueden transmitir por uno o varios vectores, dependiendo del grado de especificidad. Existen fitoplasmas con baja especificidad por el vector, como la Enfermedad X del melocotonero, CP o el AY a los que se les conocen varias especies de insectos transmisores de la enfermedad (Toth *et al.*, 1994; Maürer *et al.*, 1993). En cambio, otros fitoplasmas sólo se transmiten por un vector, como es el caso de la FD de la viña,

transmitido a la viña únicamente por el cicadélido *Scaphoideus titanus* Ball (Alma *et al.*, 1997).

El rango de plantas huésped para cada fitoplasma depende del comportamiento alimenticio del vector. Vectores monófagos u oligófagos, diseminaran el fitoplasma entre una o pocas especies vegetales, como es el caso de *Cacopsylla pyri* y el fitoplasma de PD. En cambio, si el insecto se alimenta de diferentes especies vegetales, el fitoplasma afectará a un mayor rango de plantas, como es el caso de *Macrostelus fascifrons* que transmite el fitoplasma AAY (16SrI-A, -B) a más de 191 especies de plantas diferentes (Golino *et al.*, 1989; McCoy *et al.*, 1989).

### 1.2.5 Sintomatología

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

Los síntomas que presentan las plantas con mayor frecuencia son:

- Amarilleo o clorosis
- 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 dando lugar a “escobas de bruja”
- Enanismo generalizado
- Desarreglos vegetativos
- Enrollamientos de hojas
- Decaimiento general

Algunos de estos síntomas son casi exclusivos de espiroplasmas y fitoplasmas (virescencia, filodia, escoba de bruja)



**Figura 1.5-** Síntomas característicos de la presencia de fitoplasmas en la planta: Esterilidad de las flores (a), virescencia y filodia (b), desarrollo de yemas adventicias que dan lugar a “escobas de bruja” (c, h), ausencia de lignificación (e), obturación y necrosis del floema (f), desarreglos vegetativos (g), brotación prematura (i), amarilleo de las hojas (m) o de los nervios (j), y enrojecimiento (k) y/o enrollamiento de las hojas (l).

### 1.2.6 Medidas de control.

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

La quimioterapia también puede aplicarse, no obstante en elevadas dosis puede tener efectos fitotóxicos. Se han realizado ya diversos ensayos con antibióticos, aunque no ha tenido aplicación en campo debido a que su uso no es recomendado, según publica el ministerio de agricultura, pesca y alimentación disponible en: [www.mapya.es/agricultura/pags/fitos](http://www.mapya.es/agricultura/pags/fitos).

## 1.3 El Decaimiento del peral o Pear decline (PD)

El fitoplasma causante del Decaimiento del peral (PD) se clasifica dentro del grupo 16S X subgrupo C (Lee *et al.*, 1998) o AP (Seemüller *et al.*, 1998), que engloba diferentes subgrupos, diferenciados por el patrón de bandas obtenido al digerir el ADN del gen 16S rDNA con una enzima de restricción concreta. Este fitoplasma tiene un genoma de unas 635 Kbases (Lauer & Seemüller, 2000).

### 1.3.1 Origen

La primera información acerca de la existencia de esta enfermedad, data del año 1934 en Italia, donde se conocía con el nombre de “moria” del peral (Catoni, 1934). En la década de los años 40 fue citada en USA y Canadá por McLarty (1948), pero no fue hasta

1963, que se consideró que la etiología de la enfermedad era la misma en ambas zonas geográficas (Shalla *et al.*, 1964).

El impacto de esta enfermedad en peral ha sido, y continúa siendo, muy importante. En California, entre 1959 y 1962, murieron por esta enfermedad 1.100.000 árboles (Batiste & Bulla, 1980). En áreas de cultivo del peral en Italia (Trento y Bolzano), llegaron a morir 50.000 árboles por esta misma causa. En Alemania, a principios de los 70, se registró un 27,8% de muertes en cultivos de 8 años de edad por dicha enfermedad (Németh, 1986).

En España, la sintomatología de decaimiento progresivo y muerte de peral, había sido ya observada de forma esporádica, en algunas zonas de cultivo frutícola de Lérida y Valle del Ebro desde los años 60 (Rallo, 1973), aunque no representaba un problema grave. Sin embargo, desde finales de los 80 y coincidiendo con el aumento de poblaciones de *Cacopsylla pyri* (Garreta, 1988), es una de las enfermedades del peral más extendidas, y de moderada gravedad en algunas variedades, como la pera Limonera. La confirmación por PCR del fitoplasma responsable de la enfermedad en España, data de 1994 (Avinent *et al.*, 1997).

### **1.3.2 Distribución geográfica**

En la actualidad el fitoplasma de PD se encuentra distribuido en todas las áreas dedicadas a este cultivo. Los países europeos afectados son Alemania, Austria, Bélgica, España, Francia, Grecia, Hungría, Inglaterra, Italia, Polonia, República Checa, Rumania, Rusia, Suiza y Yugoslavia, entre otros (Malinowski *et al.*, 1996; Avinent *et al.*, 1997; Serrone *et al.*, 1998). También se encuentra distribuida en Canadá, Estados Unidos, Australia y Argentina (McLarty, 1948; Schneider & Gibbs, 1997)

### **1.3.3 Sintomatología de la enfermedad del Decaimiento del peral (PD)**

Según la virulencia del fitoplasma y/o la sensibilidad de la variedad o portainjerto, las manifestaciones de la enfermedad por parte del peral, se pueden clasificar en Decaimiento Lento o “Slow Decline” y Decaimiento Rápido o “Quick Decline”.

### 1.3.3.1 Decaimiento Lento o “Slow Decline”

La enfermedad se desarrolla lentamente y los árboles pueden sobrevivir durante años.

- Síntomas en hojas y masa vegetativa: el crecimiento terminal de yemas y brotes disminuye o incluso se anula. Las hojas son menos numerosas y dispersas, y los bordes se enrollan ligeramente. Al final del verano y a veces con anterioridad, las hojas enrojecen y caen de forma prematura.
- Síntomas en frutos y yemas florales: la floración es abundante, pero con frecuencia, evoluciona mal. Los botones florales se pueden volver marrones y morir, aunque permanecen en el árbol. Las flores acaban cayendo y la producción de frutos disminuye.
- Síntomas en tronco: la madera del tronco, así como los brotes, adquieren una coloración anaranjada, mucho más evidente en los brotes. En un elevado porcentaje de árboles, se puede observar una estría necrótica en el *cambium*, inmediatamente por debajo de la línea de unión con el patrón.
- Síntomas en raíces: disminuye su longitud y el porta injerto puede llegar a morir, estando la variedad viva.

Este tipo de sintomatología puede mantenerse o remitir según las condiciones climáticas, edáficas y biológicas en las que se encuentre el árbol. En cambio, si se producen reinfecciones continuadas por ataques del vector, *Cacopsylla pyri*, los árboles pueden pasar a tener un decaimiento rápido.

### 1.3.3.2 Decaimiento rápido o “Quick decline”

Se ha observado principalmente en perales europeos injertados sobre patrones orientales (*P. calleriana*, *P. pyrifolia*, *P. serotina* y *P. ussuriensis*). Se caracteriza por el amarilleo y muerte de los árboles en pocas semanas o incluso algunos días. Las hojas y frutos se marchitan rápidamente. Las yemas y flores se abren y caen rápidamente. Esto es debido a un colapso vascular, debido a la súbita obturación de los tubos cribosos por el fitoplasma. La infección, conjuntamente con la discontinuidad vascular en el lugar del injerto, provocan un efecto sinérgico, que lleva a una rápida evolución de la enfermedad. Este proceso suele ocurrir al final del verano, justo antes de la recogida de frutos y, en plantaciones jóvenes (3, 4 años).

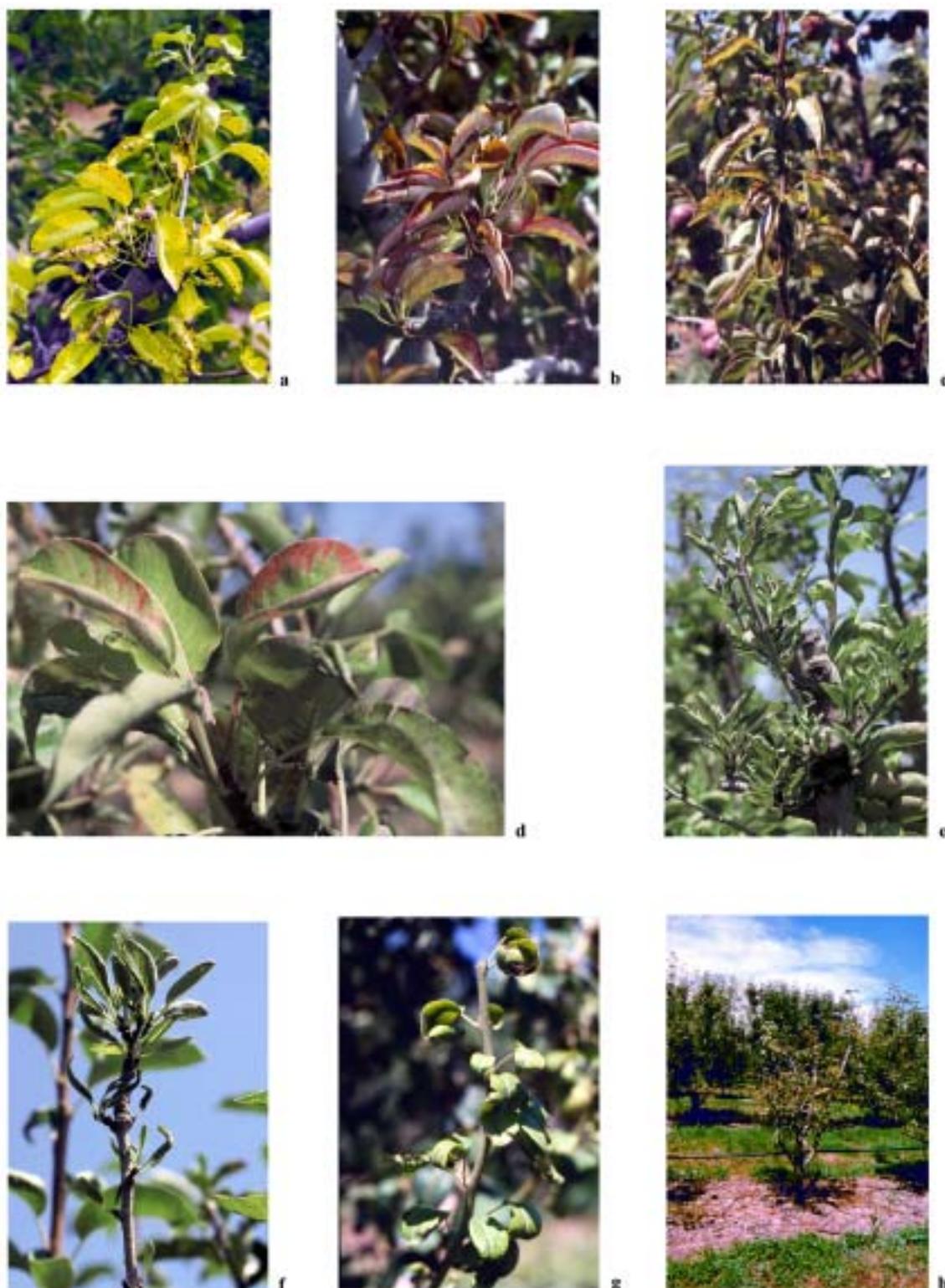
En la Figura 1.6 están representados algunos de los síntomas típicos de la enfermedad de PD.

Los síntomas de decaimiento no son específicos de esta enfermedad, por lo que debe comprobarse que no son producidos por otros factores como la asfixia radicular o las incompatibilidades patrón-injerto. También algunos virus pueden producir síntomas similares como, el decaimiento producido por el ACLSV. El virus ASPV, produce enrojecimiento de hojas, reducción de frutos y presencia de surcos en la corteza acompañados de áreas necróticas en el *cambium* (Lemoine, 1986; Nemeth, 1986; Llacer, 1988; Jelkmann *et al.*, 1992; Jelkmann, 1994). Tres virosis latentes: el jaspeado amarillo del membrillero o *Quince yellow blotch virus*, las manchas de hollín sobre membrillero o *Quince sooty ringspot virus* y el enanismo del membrillero, causado por el complejo *Quince sooty ringspot virus* y ACLSV, producen incompatibilidad patrón-injerto (Németh, 1986).

#### **1.3.4 Distribución del fitoplasma en el árbol**

Los fitoplasmas patógenos de plantas leñosas y hoja caduca, suelen seguir un ciclo a lo largo de todo el año. A mediados de primavera, y coincidiendo con la nueva formación de tubos cribosos empiezan a distribuirse por todo el árbol. Durante el otoño, alcanzan las máximas concentraciones, y con la llegada del invierno, disminuyen en la parte aérea, distribuyéndose preferentemente en las raíces (Tahama, 1975; Schaper, 1981). Existen sin embargo, algunos trabajos que indican que el fitoplasma podría encontrarse también en la parte aérea durante la dormancia invernal (Rosenberg & Jones, 1977; Schaper & Seemüller, 1982; Jaraush *et al.*, 1999)

La mayoría de estudios realizados en este campo, se han llevado a cabo en países centroeuropeos, donde las condiciones climáticas son diferentes de la de los países mediterráneos. De esta manera, sería necesario realizar un estudio comparativo en ambientes más templados.



**Figura 1.6-** Síntomas característicos de la enfermedad causada por el Decaimiento del peral. Moteado o manchas necróticas en las hojas (a, c), enrojecimiento de las hojas (b, d), enrollamiento (b, g), brotaciones y hojas pequeñas (e, f) y enanismo generalizado (h)

### 1.3.5 El vector del fitoplasma causante del Decaimiento del peral: los psílicos.

La transmisión del fitoplasma de PD de un árbol a otro, se produce únicamente a través de algunas especies del género *Cacopsylla* (O. Homoptera; Sbo. Sternorrhyncha).

La transmisión es de tipo permanente: el insecto adquiere el fitoplasma cuando se alimenta a través de la savia. El fitoplasma, mediante unos receptores de las células epiteliales se adhiere a la pared del intestino, la atraviesa y empieza a multiplicarse en el interior de las células epiteliales. Tras su multiplicación, puede atravesar la membrana plasmática para llegar a la hemolinfa, donde se continúa reproduciendo y se distribuye hacia otros tejidos. Para que estos fitoplasmas se puedan transmitir a nuevas plantas, deben alcanzar las glándulas salivales del vector (Purcell *et al.*, 1981). Cuando el vector se alimenta, los inyectará en el floema de la nueva planta (Agrios, 1997). Los insectos vectores adquieren el patógeno después de alimentarse de la planta infectada durante varias horas o días, pero no lo transmiten hasta haber pasado un período de incubación de entre 10 a 45 días (según la temperatura).

En los cultivos de perales europeos coexisten tres especies de psilas como transmisoras de la enfermedad del decaimiento del peral: *C. pyri* (L.) (Carraro *et al.*, 1998), *C. pyricola* (F.) (Jensen *et al.*, 1964) y *C. pyrisuga* (Refatti, 1967; Hibino & Schneider, 1971). La especie dominante en el sur de Europa es *C. Pyri* (Lemoine, 1984; Lemoine, 1991; Carraro *et al.*, 1998) mientras que *C. pyricola* es más frecuente en el Reino Unido y Norte América (Jensen *et al.*, 1964; Solomon *et al.*, 1989; Davies *et al.*, 1992).

En España, principalmente se ha identificado *C. pyri* (L.), especie que desde los años 80, ha ido aumentando su población, hasta el punto de considerarse como la plaga más importante del peral (Portillo *et al.*, 1993).

*C. pyri* tiene un gran potencial reproductivo. El número de generaciones es variable dependiendo de la climatología de la zona. En la provincia de Lérida encontramos entre 4 y 6 generaciones, siendo, en la mayoría de años, de 5 generaciones (García de Otazo *et al.*, 1992).

El género *Cacopsylla* es hemimetábolo (metamorfosis incompleta) pasando por los estadios de huevo, ninfa (5 estadios) y adulto. Los adultos presentan dos morfotipos: el de invierno y el de verano. La generación de invierno suele aparecer a finales de Septiembre, y pasa el invierno en estado de diáspausa en los perales o en los alrededores de la plantación. El segundo morfotipo, el estival, suele aparecer en Marzo-Abril, al eclosionar los huevos depositados por el morfotipo invernal en Febrero.

El género *Cacopsylla* además de transmitir la enfermedad de PD, puede provocar otros tipos de daños (Horton, 1999):

1- Daños causados por la melaza de las ninfas. Como en otros insectos homópteros, la psila ingiere savia y otros productos de la planta en cantidades excesivas, las cuales deben eliminar en forma de melaza durante el proceso digestivo. La psila adulta excreta estos restos en forma de productos céreos que no suelen causar daños ni a los frutos ni a la planta. Por el contrario, las psilas inmaduras excretan esta melaza en forma líquida. Ésta, resulta más dañina ya que si permanece durante un largo tiempo en contacto con la superficie del fruto, acaba produciendo manchas oscuras que bajan la calidad de la cosecha (Burts, 1970). En la melaza además puede desarrollarse la Fumagina (hongos de los géneros *Fumago* y *Limacina*).

2- Las ninfas contienen toxinas en su saliva. Éstas provocan un shock en la planta mientras el insecto se alimenta de su savia, ocasionando una disminución del crecimiento de las yemas y brotes, debilitando el árbol y, en algunos casos, provocando deformaciones y defoliaciones importantes (Beers *et al.*, 1993).

### **1.3.6 Detección del fitoplasma de PD**

Existen diferentes técnicas de diagnóstico para determinar la presencia del fitoplasma del Decaimiento del peral.

1- Indexaje: Técnica tradicional, que consiste en injertar sobre una variedad o especie sensible al fitoplasma de PD (*P. communis* variedad Decana de Comice y *Pyronia veitchii*), yemas o segmentos de tallo del árbol que se quiere analizar. Si está infectado, se observará la sintomatología propia de la enfermedad. Es un método relativamente fiable, pero lento.

2- Observación de la sintomatología: método no muy fiable en campo, debido a que los síntomas pueden ser confundidos con otras enfermedades o fisiopatías que producen efectos similares.

3- Observación microscópica: la microscopía permite visualizar la presencia o ausencia de fitoplasmas, pero no permite la diferenciación entre grupos. La tinción de ADN con fluorocromo (DAPI) permite observar la fluorescencia que se produce en presencia del fitoplasma. Sin embargo, debido a la inespecificidad de la tinción (tinción de ADN), también es posible la confusión con algunos tipos de bacterias (Seemüller, 1976; Rocha *et*

*al.*, 1986). Este problema queda resuelto con la microscopía electrónica de transmisión que permite visualizar las estructuras enteras de los fitoplasmas (Musetti *et al.*, 1992; Rudzinska-Langwald & Kaminska, 1999), de manera que se excluye la posibilidad de confundirlas con otras bacterias.

4- Hibridación de ácidos nucleicos o dot.blot mediante la utilización de sondas de ADN o ARN marcadas (Kirkpatrick *et al.*, 1987; Daire *et al.*, 1992; Saillard *et al.*, 1993; Blomquist & Kirkpatrick, 2002.). La tecnología del ADN recombinante, ha permitido clonar fragmentos de ADN que se han utilizado para detectar el fitoplasma con alta sensibilidad.

5- Detección del fitoplasma mediante PCR (Saiki *et al.*, 1988): Se basa en la utilización de secuencias de ADN como cebadores, para poder realizar una amplificación del fragmento situado entre estas secuencias. Para el diseño de cebadores en fitoplasmas, se utilizan las regiones más conservadas del gen 16S rDNA.

Como cebadores universales, que reconocen secuencias comunes a todos los fitoplasmas conocidos, se puede utilizar la pareja P1/P7 (Deng & Hiruki, 1991; Schneider *et al.*, 1995), situados en el gen 16S y 23S rDNA respectivamente, fU5/rU3 (Lorenz *et al.*, 1995) y R16F2/R2 (Lee *et al.*, 1993) situados en la región del gen 16S rDNA, entre otros. También existen secuencias específicas para determinados grupos, e incluso para un fitoplasma en concreto. Así, para identificar al grupo AP o 16SrX (Lee *et al.*, 1998; Seemüller *et al.*, 1998) que incluye fitoplasmas que afectan a un gran número de árboles frutales, como AP, PYLR, ESFY, (de melocotoneros, ciruelos y albaricoqueros) y el PD, se suele utilizar el par de cebadores fO1/rO1 (Lorenz *et al.*, 1995), cuyas secuencias se encuentran situadas en el gen 16S rDNA. En el caso del fitoplasma de PD, también suele utilizarse la pareja de cebadores fPD/rPD (Lorenz *et al.*, 1995) situados en el gen 16S rDNA y la región espaciadora 16/23S rDNA, respectivamente (Figura 1.7).

TTGATCCTAGTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGGAAACTTTTAGTTT P1 / f01  
CAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTAAGTAACCTACCTTTCAGACGAGGATAACAGTTGGAAACGACTG  
CTAAGACTGGATAGGAAGTTTTAAGGCATCTTGAACTTTTTAAAAGACCCGCAAGGGTATGCTGAGAGAT fPD  
GGGCTTGCGGCACATTAGTTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGACCATGATGTGTAGCTGGACTGAG  
AGGTTGAACGGCCACATTGGGACTGAGATACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAATTTTC  
GGCAATGGAGGAACTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGTATTTAGGTATGTAAAGTTCTTT U5  
TATTAAAGAAGAAAAAATGATGGAAAAATCATTCTGACGGTATTTAATGAATAAGCCCCGGCTAACTATG  
TGCCAGCAGCTGCGGTAATACATGGGGGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGGGTGCCTAGG  
CGGTTTAATAAGTCTATGGTCTAAGTTCACGCTTAACTGTTGTGATGCTATAGAACTGTTTACTAGAG  
TTGGATAGAGGCAAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTAAAAATGCGTAAAGATATGGAGGAACACCAGTAGC  
GAAGGCGGCTTGCTGGGTCTTAACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACC  
CTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTACTAAGTGTGGGTAAACCAGTGC TGAAGTTAACGCATTAA  
GTACTCCGCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCGGT  
GGATCATGTTGTTTAAATTCGAAGATACACGAAAAACCTTACCAGGTCTTGACATACTCTGCAAAGCTATA  
GAAATATAGTGGAGGTTATCAGGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTG  
GGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCGCTAGTTACCATCATTTAGTTGGGCACTTTAGTGAGAC rO1  
TGCCAATGATAAATTTGGAGGAAGGTGGGGATTACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACAA  
ACGTGATACAATGGCTGTTACAAAGAGTAGCTGAAGCCTGAGTTTTTTAGCAAATCTCAAAAAAACAGTCT U3  
R16R2  
CAGTTCGGATTGAAGTCTGCAACTCGACTTCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTC  
GTGGTGAATACGTTCTCGGGGTTTGTACACACCCGCGTCAAACCATGAAAGTTGACAATACCCGAAACC  
AGTAGCCTAACTTGCAAAAGAGGGAAGTGTCTAAGGTAGGGTTGATGATTGGGGTTAAGTTCGTAACAAGG  
TATCCCTACCCGAAAGGTGGGGATGGATCACCTCCTTTCTAAGGAAAATATCATCTTCAGTTGTGAAAGAC  
TTAAAAAAGTTTTTTTATTTTTTAAGATAAAAATTAATAATGGCCGGGGCCTATAGCTCAGTTGGTTAG rPDs  
AGCACACGCCTGATAAGCGTGAGGTCGATGGTTCGAGTCCATTTAGGCCACCAAAAAATATTT

**Figura 1.7-** Secuencia del gen 16S rDNA y la región espaciadora 16/23S rDNA del fitoplasma de PD. Situación de los diferentes tipos de cebadores. La secuencia subrayada corresponde a la región espaciadora entre el 16S rDNA y 23S rDNA.

Existen también otros cebadores ribosómicos y no ribosómicos específicos para el grupo AP así como para el fitoplasma de PD (Jaraush *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1995; Lorenz *et al.*, 1995).

## 1.4 Objetivos generales

Con la intención de ampliar los conocimientos que hasta el momento hay acerca de la enfermedad del Decaimiento del peral en España, se han planteado los siguientes objetivos:

- 1- Evaluar mediante una prospección visual, la extensión actual de la enfermedad de PD en la provincia de Lérida.
- 2- Determinar qué fitoplasma o fitoplasmas causan la enfermedad de PD en Cataluña.
- 3- Estudiar qué factores influyen en la detección del fitoplasma de PD y analizar qué momento es el idóneo para identificar la enfermedad.
- 4- Analizar el estado funcional del fitoplasma de PD en la parte aérea del árbol durante el invierno.
- 5- Determinar si *Cacopsylla pyri* es vector del fitoplasma de PD en España y evaluar la posible influencia del sexo del vector en la transmisión
- 6- Desarrollar una metodología sencilla para separar el ADN del genoma del fitoplasma del de la planta huésped
- 7- Aplicar la técnica anterior para secuenciar y caracterizar algunos fragmentos del genoma de PD.
- 8- Evaluar mediante PCR e hibridación por dot.blot la especificidad de algunos de los fragmentos de ADN obtenidos.

Cada uno de estos objetivos se encuentra desarrollado específicamente en los capítulos siguientes.

## 1.5 Bibliografía

- Agrios, G. N., 1997. Plant diseases caused by Mollicutes: phytoplasmas and spiroplasmas. In *Plant Pathology*, 4th, pp. 457-470. G. N. Agrios (Ed). New York: Academic Press.
- Alma, A., Bosco D., Danielli, A., Bertaccini, A., Vibio, M., Arzone, A., 1997. Identification of phytoplasmas in eggs, nymphs and adults of *Scaphoideus titanus* Ball reared on health plants. *Insect Mol. Biol.* 6(2), 115-121.
- Anuario de estadística agroalimentaria, 2001. Ministerio de Agricultura, pesca y alimentación. Centro de publicaciones paseo de la Infanta Isabel I. Madrid.
- Avinent, L., Llacer, G., Almacellas, J., Tora, R., 1997. Pear decline in Spain. *Plant Pathol.* 46, 694-698.
- Batiste, W.C., Bulla, A.D., 1980. Establishment, spread and current distribution of pear psylla in Western Colorado. Colorado State University Experiment Station Progress Report 11, Fort Collins, CO, 3pp.
- Beers, E.H., Brunner, J.F., Willet, M.J., Warner, G.M., 1993. Orchard pest management: A resource book for the Pacific Northwest. Yakima, WA: Good fruit grower.
- Berg, M., Davies, D. L., Clark, M. F., Vetten, H. J., Maier, G., Marcone, C., Seemüller, E., 1999. Isolation of the gene encoding an immunodominant membrane protein of the apple proliferation phytoplasma, and expression and characterization of the gene product. *Microbiology* 145, 1937-1943.
- Berg M., Seemüller. E., 1999. Chromosomal organization and nucleotide sequence of the genes coding for the elongation factors G and Tu of the apple proliferation phytoplasma. *Gene* 226, 103-109.
- Berg, M., Yu, J., Melcher, U., Fletcher, J., 2000. *Spiroplasma citri* putative adhesin P89: development of serological and molecular markers. *Phytopathology* 90, S6.
- Bertaccini, A., Davis, R.E., Lee, I.M., Conti, M., Dally, E.L., Douglas, S.M., 1990. Detection of chrysanthemum yellows mycoplasma-like organism by Dot hybridisation and Southern blot analysis. *Plant Dis.* 74, 40-43.
- Blomquist, C.L., Barbara, D.J., Davies, D.L., Clark, M.F., Kirkpatrick, B.C., 2001. An immunodominant membrane protein gene from the western X-disease phytoplasma is distinct from those of other phytoplasmas. *Microbiology (reading)* 147 (3), 571-580.
- Blomquist, C.L., Kirkpatrick, B.C., 2002. Frequency and seasonal distribution of pear psylla infected with the pear decline phytoplasma in California pear orchards. *Phytopathology* 92 (11), 1218-1226.
- Boudon-Padieu E., Grenan, S., 2002. Hot water treatment. In "Methods", ICVG home page. <http://www.icgv.ch>.

- Boudon-Padieu, E., Larrue, J., Caudwell, A., 1989. ELISA and Dot-blot detection of Flavescence dorée-MLO in individual leafhopper vectors during latency and inoculative state. *Curr. Microbiol.* 19, 357-364.
- Burts, E.C., 1970. The pear psylla in central Washington. Washington State University, Washington Agricultural Experiment Station circular 516, WA: Pullamn, 13pp.
- Carraro, L., Loi, N., Ermacora, P., Gregoris, A., Osler, R., 1998. Transmission of pear decline by using naturally infected *Cacopsylla pyri*. *Acta Hortic* 472, 665-668.
- Catoni, G., 1934. Casi di deperimento di peri e di meli. *Boll. Agr.* 47, 148-150.
- Chen, J., Chang, C.J., Jarret, R.L., 1992. DNA probes as molecular markers to monitor the seasonal occurrence of walnut witches' broom mycoplasma-like organism. *Plant Dis.* 76, 1116-1119.
- Condon, C., J. Philips, A.Fu, C. Squires., Squires. C.L., 1992. Comparison of the expression of the seven ribosomal RNA operons in *Escherichia coli*. *EMBO J.* 11, 4175-4185
- Daire, X., Boudon-Padieu, E., Berville, A., Schneider, B., Caudwell, A., 1992. Cloned DNA probes for detection of grapevine flavescence dorée mycoplasma-like organism (MLO). *Ann. Appl. Biol.* 121, 95-103.
- Dalmau, R., Iglesias, I., 1999. La fruita dolça a LLeida: evolució històrica i anàlisi de la situació actual. Institut d'estudis Llerdencs. LLeida. 203pp
- Davies, D.L., Guise, C.M., Clark, M.F., Adams, N.A., 1992. Parry's disease of pears is similar to pear decline and associated with mycoplasma-like organisms transmitted by *Cacopsylla pyricola*. *Plant Pathol.* 41, 194-203.
- Davis, M.J., Tsai, J.H., Cox, R.L., McDaniel, L.L., Harrison, N.A., 1988. Cloning of chromosomal and extrachromosomal DNA of the mycoplasma-like organism that causes maize bushy stunt disease. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 1, 295-302.
- Deng, S., Hiruki, C., 1991. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and nonculturable mollicutes. *J. Microbiol. Meth.* 14, 53-61.
- Doi, Y., Terenaka, M., Yora, K., Asuyama, H., 1967. Mycoplasma or PPLT group-like microorganisms found in the phloem elements of plant infected with mulberry dwarf, potato witches' broom, aster yellows, or pawlonia witches' broom. *Ann. Phytopathol. Soc. Jap.* 33, 259.
- Garcia de Otazo, J., Sió, J., Torá, R., Torá, M., 1992. Psila. In: Agrolatino (Ed) Peral. Control integrado de plagas y enfermedades (pp. 173- 182) Agrolatino, Barcelona, Spain.
- Garreta, I., 1988. Evolución y control de la *Psylla pyri* L. en la zona frutícola de Lérida (Cataluña, España). N° 18, Pág. 65
- Golino, D.A., Oldfield, G.N., Gumpf, D.J., 1989. Experimental hosts of the beet leafhopper-transmitted virescence agent. *Plant Dis.* 7, 850-854.
- Gutell, R.R., Larsen, N., Woese, C. R., 1994. Lessons from an evolving rRNA: 16S and 23S rRNA structures from a comparative perspective. *Microbiol. Rev.* 58, 10-26

- Hanboonsong, C., Choosai, S., Panyim, Damak, S., 2002. Transovarial transmission of sugarcane white leaf phytoplasma in the insect vector *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura). *Insect Mol. Biol.* 11 (1), 97.
- Hibino, H., Kaloostian, G.H., Schneider, H., 1971. Mycoplasma bodies in the pear psylla vector of pear decline. *Virology* 43, 33-40.
- Horton, D.R., 1999. Monitoring of pear psylla for pest management decisions and research. *Integrat. Pest Manage Rev.* 4, 1-20.
- Jarausch, W., Lansac, M., Dosba, F., 1999. Seasonal colonization pattern of European stone fruit yellows phytoplasmas in different *Prunus* species detected by specific PCR. *J. Phytopathol.* 147, 47-54.
- Jarausch, W., Saillard, C., Dosba, F., Bové, J. M., 1994. Differentiation of mycoplasma-like organisms (MLOs) in European fruit trees by PCR using specific primers derived from sequence of a chromosomal fragment of the apple proliferation MLO. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 2916-2923
- Jelkmann, W., 1994. Nucleotide sequences of apple stem pitting virus and of the coat protein gene of a similar virus from pear associated with vein yellows disease and their relationship with potex and carlavirus. *J. Gen. Virol.* 75 (7), 1535-1542.
- Jelkmann, W., Kunze, L., Vetten, H. J., Lesemann, D.E., 1992. cDNA cloning of dsRNA associated with apple stem pitting disease and evidence for the relationship of the virus-like agents associated with apple stem pitting and pear vein yellows. *Acta Hort.* 309, 55-62.
- Jensen D.D., Griggs W.H., Gonzales C.Q., Schneider, H., 1964. Pear decline virus transmission by pear psylla. *Phytopathology* 54, 1346-1351.
- Kirkpatrick, B.C., Smart, C., Blomquist, C., Guerra, L., Harrison, N., Ahrens, U., Lorenz, K. H., Schneider, B., Seemüller, E., 1994. Identification of MLO-specific PCR primers obtained from 16S/23S rRNA spacer sequences. *Proceeding of the 10<sup>th</sup> International Congress of the International Organization for Mycoplasmaology (IOM).* 261-262.
- Kirkpatrick, B.C., Stenger, D.C., Morris, T.J., Purcell, A.H., 1987. Cloning and detection of DNA from a nonculturable plant pathogenic mycoplasma-like organism. *Science* 238, 197-199.
- Kollar, A., Seemüller, E., 1989. Base composition of the DNA of mycoplasma-like organisms associated with various plant diseases. *J. Phytopathol.* 127, 177-186.
- Kollar, A., Seemüller, E., Bonnet, F., Saillard, C., Bové, J.M., 1990. Isolation of the DNA of various plant pathogenic mycoplasma-like organisms from infected plants. *Phytopathology* 80, 233-237.
- Kuan, C.P., Su, H.J., 1998. Development of cloned probes for phytoplasma associated with Loofah witches' broom. *J. Phytopathol.* 146, 309-313.

- Kuboyama, T., ChiehChen. H., Lu Xiao Yun., Sawayanagi,T., Kanazawa,T., Kagami, T., Matsuda, I., Tsuchizaki, T., Namba, S., 1998. A plasmid isolated from phytopathogenic onion yellows phytoplasma and its heterogeneity in the pathogenic phytoplasma mutant. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11 (11), 1031-1037.
- KuoChieh, Ho., 2001. Cloning and nucleotide sequence analysis of a *tuf* gene from loofah witches' broom phytoplasma. *Taiwania* 46 (4), 285-294.
- Kuske, C. R., Kirkpatrick, B.C., 1992. Phylogenetic relationships between the western aster yellows mycoplasma-like organism and the other procaryotes established by 16S rDNA gene sequence. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42, 226-233.
- Kuske, C.R., Kirkpatrick, B.C., Seemuller, E., 1991. Differentiation of virescence phytoplasmas using western aster yellows mycoplasma-like organism chromosomal DNA probes and restriction fragment length polymorphism analysis *J. Gen. Microbiol.* 137, 153-159.
- Lauer, U., Seemüller, E., 2000. Physical map of the chromosome of the apple proliferation phytoplasma. *J. Bacteriol.* 182, 1415-1418.
- Lee, I.-M., Bertaccini, A., Vibio, M., Gundersen-Rindal, D.E., 1995. Detection of multiple phytoplasmas in perennial fruit trees with decline symptoms in Italy. *Phytopathology* 85, 728-735.
- Lee, I.-M., Davis, R.E., DeWitt, N.D., 1990. Nonradioactive screening method for isolation of disease-specific probes to diagnose plant diseases caused by mycoplasma-like organisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1471-5.
- Lee, I.-M., Gundersen-Rindal, D.E., Davis, R.E., Bartoszyk, I.M., 1998. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48, 1153-1169.
- Lee, I.-M., Hammond, R.W., Davis, R.E., Gundersen-Rindal, D.E., 1993. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology* 83, 834-842.
- Lemoine, J., 1984. Is *Psylla pyri* a vector of pear decline in France? *Bulletin-SROP.* 7 (5), 245-251.
- Lemoine, J., 1986. Les maladies de dégénérescence du poirier et du pommier. *Phytoma* 380:22-26.
- Lemoine, L., 1991. Deperissement du poirier: role de *Psylla pyri* dans sa dissemination. *Arboriculture Fruitière* 442, 28-32.
- Lepka, P., Stitt, M., Moll, E., Seemüller, E., 1999. Effect of phytoplasmal infection on concentration and translocation of carbohydrates and amino acids in periwinkle and tobacco. *Physiol. Mol. Plant P.* 55, 59-68.
- Liefting, L.W., Kirkpatrick, B.C., 2003. Cosmid cloning and sample sequencing of the genome of the uncultivable mollicute, Western X-disease phytoplasma, using DNA purified by pulsed-field gel electrophoresis. *FEMS Microbiol. Lett.* 221 (2), 203-211.

- Lim, P.O., Sears, B.B., 1989. 16S rRNA sequence indicates that plant-pathogenic mycoplasma-like organisms are evolutionarily distinct from animal mycoplasmas. *J. Bacteriol.* 171, 5901-5906.
- Lim, P.O., Sears, B.B., 1992a. Evolutionary relationships of a plant-pathogenic mycoplasma-like organism and *Acholeplasma laidlawii* deduced from two ribosomal protein gene sequences. *J. Bacteriol.* 174, 2606-2611.
- Lim, P.O., Sears, B. B., 1992b. Membrane properties of a plant-pathogenic mycoplasma-like organism. *J. Bacteriol.* 174, 682-686
- Llácer, G., 1988. Virosis del peral. *Fruticultura Profesional* 18, 67-73.
- Lombard, P.B., Westwood, M.N., 1987. Pear rootstock. Row C.R., Carlson R.F. Rootstocks for fruit crops. 145-183.
- Lorenz, K.-H., Schneider, B., Ahrens, U., Seemüller, E., 1995. Detection of the apple proliferation and pear decline phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and nonribosomal DNA. *Phytopathology* 85, 771-776.
- Malinowski, T., Zandarski, J., Komorowska, B., Zawadzka, B., 1996. Detection of pear decline phytoplasma in declining pear trees in Poland. *Plant Dis.* 80, 464.
- Mäurer, R., Seemüller, E., Sinclair, W.A., 1993. Genetic relatedness of mycoplasma-like organisms affecting elm, alder, and ash in Europe and North America. *Phytopathology* 83, 971-976.
- McCoy, R.E., Caudwell, A., Chang, C.J., Chen, T.A., Chiykowski, L.N., Cousin, M.T., Dale, J.L., de Leeuw, G.T.N., Golino, D.A., Hackett, K.J., Kirkpatrick, B.C., Marwitz, R., Petzold, H., Sinha, R.C., Sugiura, M., Whitcomb, R.F., Yong, I.L., Zhu, B.M., Seemüller, E., 1989. Plant diseases associated with mycoplasma-like organisms. *The Mycoplasmas, Vol V.* In: Whitcomb, R.F., Tully, J.G. (eds.), Academic Press, New York, pp. 545-640.
- McLarty, H. R., 1948. Killing of pear trees. *Ann. Rep. Canad. Plant Dis. Survey* 28, 77.
- MengLing. W., TunTschu Ch., LaingChour W., ChuenHsu, F., 2002. Rapid detection of phytoplasma associated with paulownia witches'-broom using a nonradioactive DNA probe and a PCR-based assay. *Taiwan J. Forest Sci.* 172, 123-133.
- Mergenthaler, E., Viczian, O., Fodor, M., Sule, S., 2001. Isolation and expression of an immunodominant membrane protein gene of the ESFY phytoplasma for antiserum production. *Acta Hort.* 550 (2), 355-360.
- Milne, R.G., Ramasso, E., Lenzi, R., Masenga, V., Sarindu, S., Clark, M.F., 1995. Pre- and Post-embedding immunogold labeling and electron microscopy in plant host tissues of three antigenically unrelated MLOs: primula yellows, tomato big bud and bermudagrass whiteleaf. *Netherlands J. Plant Pathol.* 101, 57-67.
- Morton, A., Davies, D.L., Blomquist, C.L., Barbara, D.J., 2003. Characterization of homologues of the apple proliferation immunodominant membrane protein gene from three related phytoplasmas. *Mol. Plant Pathol.* 4 (2), 109-114.

- Musetti, R., Favali, M.A., Carraro, L., Osler, R., 1992. An attempt to differentiate by microscopic methods two plant mycoplasma-like organisms. *Cytobios* 72, 71-82.
- Musetti, R., Favali, M.A., Pressacco, L., 2000. Histopathology and polyphenol content in plants infected by phytoplasmas. *Cytobios* 102, 133-147.
- Musetti, R., Scaramagli, S., Vighi, C., Pressaco, L., Favali, M.A., 1999. The involvement of polyamines in phytoplasma-infected periwinkle (*Catharanthus roseus* L.) plants. *Plant Biosyst.* 133 (1), 37-45.
- Nakashima, K., Hayashi, T., 1995. Extrachromosomal DNAs of rice yellow dwarf and sugarcane white leaf phytoplasmas. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan.* 61 (5), 456-462.
- Neimark, H.C., Kirkpatrick, B.C., 1993. Isolation and characterization of full-length chromosomes from non-culturable plant-pathogenic mycoplasma-like organisms. *Mol. Microbiol.* 7, 21-28.
- Németh, M., 1986. Virus, Mycoplasma and Rickettsia diseases of fruit trees. Martinus Nijhoff and W. Junk ed. Budapest. 841pp.
- Nishigawa, H., Miyata, S.I., Oshima, K., Sawayanagi, T., Komoto, A., 2001. In planta expression of a protein encoded by the extrachromosomal DNA of a phytoplasma and related to geminivirus replication proteins. *Microbiology* 147, 507-513.
- Oshma, K., Miyata, S., Sawayanagi, T., Kakizawa, S., Nishigawa, H., Jung, H., Furuki, K., Yanazaki, M., Suzuki, S., Wei, W., Kuboyama, T., Ugaki, M., Namba S., 2002. Minimal set of metabolic pathways suggested from the genome of onion yellows phytoplasma. *J. Gen. Plant Pathol.* 68 (2), 212.
- Padovan, A.C., Firrao, G., Schneider, B., Gibb, K.S., 2000. Chromosome mapping of the sweet potato little leaf phytoplasma reveals genome heterogeneity within the phytoplasmas. *Microbiology (Reading)* 146 (4), 893-902.
- Pertot, I., Musetti, R., Pressacco, L., Osler, R., 1998. Changes in indole-3-acetic acid level in micropropagated tissues of *Catharanthus roseus* infected by the agent of the clover phyllody and effect of exogenous auxins on phytoplasma morphology. *Cytobios* 95, 13-23.
- Portillo, J., Botargues, A., Cabiscol, P., Moreno, A., Costa, J., 1993. Evaluación de la eficacia de varios insecticidas contra *Cacopsylla pyri* (L.) (=Psylla pyri(L.)) en ensayos de campo. *Fructicultura profesional* 55, 25-35.
- Purcell, A. H., Richardson, J., Finlay, A., 1981. Multiplication of the agent of X-disease in a non-vector leafhopper *Macrostelus fascifrons*. *Ann Appl Biol* 99, 283-289.
- Rallo, L., 1973. Decaimiento del peral en plantaciones del Valle del Ebro. *An. INIA/ Ser protección vegetal* 3, 147-205.
- Razin, S., 1992. Mycoplasma taxonomy and ecology. *Mycoplasmas*. J. Maniloff ed. Washington. American Soc. for Microbiol. 3-22.
- Refatti, E., 1967. Pear decline and moria. *Tech. Commun. Commonw. Bur. Hort. Plantn Crops.* 30 (Suppl N°1: 108a-108h)

- Rocha, A., Ohki, S.T., Hiruki, C., 1986. Detection of mycoplasma-like organism in situ by indirect immunofluorescent microscopy. *Phytopathology* 76, 864-868.
- Rosenberg, D.A., Jones, A.L., 1977. Seasonal variation in infectivity of inoculum from X-diseased peach and choke-cherry plants. *Plant Disease Repr.* 61, 1022-1024.
- Rudzińska-Langwald, A., Kamińska, M., 1999. Cytopathological evidence for transport of phytoplasma in infected plants. *Acta Soc. Bot. Pol.* 68(4), 261-266.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H., 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA-polymerase. *Science* 239, 487-491.
- Saillard, C., Bonnet, F., Bouneau, L., Dosba, F., Seemüller, E., Bové, J.M., 1993. DNA probes for detection of apple proliferation and chlorotic leaf roll MLOs. *Phytopathol. Medit.* 32, 80.
- Schaper, U., 1981. Untersuchungen zum Nachweis und Besiedlungsverhalten sowie zur Bekämpfung der Erreger der Triebsucht des Apfels und des Birnenverfalls. University of Göttingen. Dissertation.
- Schaper, U., Seemüller, E., 1982. Condition of the phloem and the persistence of mycoplasma-like organisms associated with apple proliferation and pear decline. *Phytopathology* 72, 736-742.
- Schneider, B., Ahrens, U., Kirkpatrick, B. C., Seemüller, E., 1993. Classification of plant-pathogenic mycoplasma-like organisms using restriction-site analysis of PCR-amplified 16S rDNA. *J. Gen. Microbiol* 139, 519-527.
- Schneider, B., Gibbs, K., 1997. Detection of phytoplasmas in declining pears in southern Australia. *Plant Dis.* 81, 254-258.
- Schneider, B., Gibb, K.S., Seemüller, E., 1997. Sequence and RFLP analysis of the elongation factor Tu gene used in differentiation and classification of phytoplasmas. *Microbiology* 143, 3381-3389.
- Schneider, B., Seemüller, E., Smart, C. D., Kirkpatrick, B. C., 1995. Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas. In: *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmaology*, Vol. 2. Ed. by Razin, S.; Tully, J. G. New York: Academic Press, pp. 369-380.
- Sears, B.B., Lim, P., Holland, N., Kirkpatrick, B.C., Klomparens, K.L., 1989. Isolation and characterization of DNA from mycoplasma-like organism. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 2, 175-180.
- Seemüller, E., 1976. Investigations to demonstrate mycoplasma-like organisms in diseased plants by fluorescence microscopy. *Acta Hort.* 67, 109-112.
- Seemüller, E., Marcone, C., Lauer, U., Ragozzino, A., Göschl, M., 1998. Current status of molecular classification of the phytoplasmas. *J. Plant Pathol.* 80, 3-26.

- Serrone, P.D., Starza, S.L., Krystai, L., Kolber, M., Barba, M., 1998. Occurrence of apple proliferation and pear decline phytoplasmas in diseased pear trees in Hungary. *J. Plant Pathol.* 80, 53-58.
- Shalla, T. A., Carroll, T. W., Chiarappa, L., 1964. Transmission of pear decline by grafting. *Calif. Agric.* 18, 4-5.
- Solomon, M. G., Cranham, J. E., Easterbrook, M.A., Fitzgerald, J.D., 1989. Control of the pear psyllid, *Cacopsylla pyricola*, in South East England by predators and pesticides. *Crop Prot.* 8, 197-205.
- Tahama, Y., 1975. Studies on the mulberry dwarf disease. XXIII. Electron microscopic examination on the mycoplasma-like organisms in the overwintered mulberry trees. *Bull. Hiroshima Agric. Coll.* 5, 151-158.
- The IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team - Phytoplasma taxonomy group (2003). Description of the genus 'Candidatus Phytoplasma', a taxon for the non-helical wall-less prokaryotes colonizing plant phloem and insects. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, submitted.
- Toth, K.F., Harrison, N.A., Sears, B.B., 1994. Phylogenetic relationships among members of the class mollicutes deduced from *rps3* gene sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44, 119-124.
- Tully, J.G., 1989. Class Mollicutes: new perspectives from plant and arthropod studies. *The Mycoplasmas* VR. F. Whitcomb and J.G. Tully ed. New York Academic Press. 1-31.
- Weisburg, W.G., Tully, J.G., Rose, D.L., Petzel, J.P., Oyaizu, H., Yang, D., Mandelco, L., Sechrest, J., Lawrence, T.G., Etten, J.V., Maniloff, J., Woese, C.R., 1989. A phylogenetic analysis of the mycoplasmas: basis for their classification. *J. Bacteriol.* 171, 6455-6467.
- Whittaker, R.H. 1969. New concepts of kingdoms of organisms. *Science* 163, 150-161.
- Wise, K. S., D. Yogeve., Rosengarten, R., 1992. Antigenic variation, In: *Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis.* p. 473-489. J. Maniloff, R. N. McElhaney, L. R. Finch, and J. B. Baseman (ed.), American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Woese, C.R., Kandler, O., Wheelis, M.L., 1990. Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 4576-4579.
- Woese, C.R., Maniloff, J., Zablen, L.B., 1980. Phylogenetic analysis of the mycoplasmas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77, 494-498.
- Ye, F. C., Melcher, U., Fletcher, J., 1997. Molecular characterization of a gene encoding a membrane protein of *Spiroplasma citri*. *Gene* 189, 95-100.
- Yu, Y.-L., Yeh, K.-W., Lin, C.-P., 1998. An antigenic protein gene of a phytoplasma associated with sweet potato witches' broom. *Microbiology* 144, 1257-1262.

# 2

## **Incidencia, expresión de síntomas y caracterización del fitoplasma asociado a la enfermedad del Decaimiento del peral en Cataluña.**

### **Resumen**

Se ha realizado una prospección en 1500 parcelas de cultivo de peral, para evaluar la extensión de la enfermedad del Decaimiento del peral (PD) en el Nordeste de España. Un 7% de las parcelas observadas presentaron síntomas de la enfermedad. Paralelamente, se ha evaluado la incidencia de la enfermedad en 45 de estas parcelas, por inspección visual de 500 árboles, en cada una de ellas. En Septiembre, la incidencia de árboles con síntomas osciló entre un 8 y un 59%, dependiendo de la variedad. La presencia del fitoplasma fue confirmada mediante nested-PCR. Finalmente, la caracterización del fitoplasma mediante PCR y posterior RFLP del ADN del fitoplasma, de muestras de distintas variedades cultivadas en Cataluña, indicó que la enfermedad estaba causada por un único fitoplasma, el fitoplasma de PD.

Se ha evaluado la expresión de síntomas de la enfermedad de PD a lo largo del año, en tres variedades distintas. Cada variedad presentó unos síntomas asociados característicos, hecho que puede ser de utilidad en nuevas prospecciones. A pesar de ello, la valoración de la extensión de la enfermedad a través de la observación de síntomas, no se presenta como la metodología más adecuada para evaluar la diseminación de esta enfermedad.

Palabras clave: Incidencia, sintomatología, PCR, RFLP

## 2.1 Introducción

La enfermedad del Decaimiento del peral (PD), está actualmente distribuida en todos aquellos países dedicados al cultivo del peral y presenta una sintomatología característica asociada (Németh, 1986). La severidad de esta enfermedad depende de varios factores, como pueden ser la combinación porta injerto-variedad (Seemüller *et al.*, 1998a), o las condiciones climatológicas o edáficas (Schneider, 1970).

En España, los síntomas de la enfermedad se describieron por primera vez en 1973 (Rallo, 1973), pero la identificación mediante PCR del agente causal no se realizó hasta 1994 (Avinent *et al.*, 1997). Observaciones realizadas por el servicio de protección vegetal de Lérida ese mismo año, señalaron que la incidencia de la enfermedad podía ser de alrededor del 80% (Avinent *et al.*, 1997).

Existen estudios realizados en vid donde se demuestra que plantas infectadas por determinados fitoplasmas, tienen capacidad de recuperarse. Esta recuperación, si el insecto vector no reinfecta la planta, suele darse en los 3 o 4 años siguientes a la infección, (Osler *et al.*, 2003). La recuperación supone una desaparición de síntomas (Mutton *et al.*, 2002), sin que ello conlleve a la desaparición del fitoplasma (Seemüller *et al.*, 1998a), sin embargo recientes estudios en vid y diferentes especies del género *Prunus*, abogan también por una disminución, o incluso desaparición del fitoplasma en las hojas (Zucchetto, 1998; Kison & Seemüller, 2001; Osler *et al.*, 2003). A pesar de todo, la recuperación siempre está condicionada a las condiciones climatológicas, edáficas y al control del vector.

Teniendo en cuenta estos estudios previos, uno de los objetivos de este trabajo ha sido evaluar, mediante una nueva prospección, la incidencia de árboles con síntomas característicos de la enfermedad, en la provincia de Lérida. Los resultados han sido comparados con los datos de años anteriores, para analizar si ha habido una remisión de síntomas o ha habido un aumento. Paralelamente, han sido investigados cuales son los síntomas más característicos de la enfermedad en tres de las variedades más cultivadas en España.

Por último, destacar que a pesar de que la enfermedad de PD suele estar asociada a la presencia del fitoplasma de PD (grupo AP), existen trabajos recientes donde se han detectado otros fitoplasmas diferentes (Martinez Culebras *et al.*, 2000; Del Serrone *et al.*, 1998). Para determinar que fitoplasma o fitoplasmas están presentes en nuestra área geográfica y causan la enfermedad de PD, han sido analizadas por PCR y RFLP perales afectados de diferentes variedades cultivadas en Cataluña.

## **2.2 Material y métodos**

### **2.2.1 Extensión de la enfermedad de PD en el Nordeste de España**

En Septiembre del año 2000, se evaluó cuál era la extensión de la enfermedad de PD en 15 localidades de la Provincia de Lérida. Para ello, se realizó una prospección visual en un total de 1500 parcelas de aproximadamente 1 Ha cada una. En cada una de estas parcelas, se registró la ausencia / presencia de síntomas de la enfermedad. Se consideró que una parcela estaba afectada, cuando mostraba síntomas característicos de “slow decline” o decaimiento lento, como clorosis, manchas necróticas, cambio en el color de las hojas, enrollamiento suave de las hojas, disminución de la masa vegetativa, brotes pequeños, disminución del crecimiento apical o filodia, entre otros.

### **2.2.2 Incidencia de la enfermedad de PD en distintas variedades de peral afectadas**

Se estudió la incidencia de PD (PDI) en 45 del total de parcelas en las que se habían registrado síntomas de la enfermedad. Se escogieron parcelas de diferentes variedades: Limonera (28 parcelas); Bartlett (7); Williams (6) y Blanquilla (4). En cada una de ellas, se evaluó la incidencia de la enfermedad por un reconocimiento visual de 500 árboles y se recogieron de forma aleatoria muestras de 10 árboles para su posterior análisis mediante PCR, en laboratorio.

#### 2.2.2.1 Detección del fitoplasma

Para la identificación del fitoplasma mediante PCR, se realizó una extracción de ácidos nucleicos, según la metodología descrita por Ahrens & Seemüller (1992).

Extracción de ácidos nucleicos:

Se introdujo 1 g del material vegetal correspondiente (nervios, yemas o floema del tallo) y se añadieron 10 ml de tampón PGB (0,1M  $K_2HPO_4$ ; 0,03M  $KH_2PO_4$ , pH 7,6; 0,3 M sacarosa; 0,15% BSA; 2% PVP) con 0,03 M L (+) ácido ascórbico. La muestra se homogeneizó y el extracto vegetal resultante se transfirió a un tubo de centrifugación de 1,9 ml. Posteriormente se clarificó el extracto mediante centrifugación a 4500 rpm durante 5 min. a 4°C. El precipitado fue resuspendido en 1 ml de tampón CTAB (Tris-HCl 100mM; EDTA 0,5M; NaCl 1,4M con CTAB al 2% (P/V)) y 2-mercaptoetanol al 0,1%

(V/V), y la mezcla se llevó a incubar durante 20 min. a 65°C al baño maría. Tras la incubación se añadió cloroformo (v/v), se mezcló todo por inversión y se centrifugó a 12000 rpm durante 10 min. a T<sup>a</sup> ambiente. La fase superior que se obtuvo fue transferida a un nuevo tubo de centrifugación de 1,5 ml, se añadió isopropanol frío (V/V) y tras mezclar suavemente por inversión la mezcla se incubó durante 20 min a 4°C. Posteriormente se realizó una centrifugación durante 15 min a 12000 rpm a 4°C. El precipitado final se lavó con 300 µl de etanol 70% centrifugando durante 5 min a 12000 rpm y a 4°C.

Detección del fitoplasma mediante amplificación del ADN:

Se realizaron dos nested-PCR. En la primera amplificación se utilizaron los cebadores universales P1 (Deng & Hiruki, 1991) y P7 (Schneider *et al.*, 1995). En cada reacción se utilizaron 5-10 ng de ADN y 20 µl de una reacción compuesta por 0,250 µM de cada cebador, 3 unidades de Taq DNA polimerasa (Promega, Madison, USA), 250 µM de dNTPs, 2 µl de tampón para Taq 10X (15 mM Cl<sub>2</sub>Mg; 100 mM Tris-HCl (pH 9); 500 mM KCl; 1,1% de gelatina) y 3 mM Cl<sub>2</sub>Mg. La reacción de amplificación se llevó a cabo en un termociclador Techne (Genius) con una desnaturalización inicial de 2 min a 95°C, seguida de 30 ciclos que consistían en una desnaturalización de 30 s a 94°C, hibridación de 30 s a 55°C y una elongación a 72°C durante 1min 45 s. La extensión final fue a 72°C durante 10 min.

Para la segunda amplificación, se utilizaron dos µl de una dilución 1:50 de la primera amplificación y se realizaron paralelamente 2 PCRs, una con los cebadores específicos fO1/rO1 (Lorenz *et al.*, 1995), que reconocen y amplifican los fitoplasmas pertenecientes al grupo AP, y otra, con los cebadores universales fU5/rU3. Los reactivos fueron los mismos que en la primera amplificación, a excepción de la concentración de los iniciadores (0,375 µM) y las condiciones de amplificación:

-Para fO1/rO1: una desnaturalización inicial de 95°C durante 2 min, seguida de 35 ciclos que consistían en una desnaturalización a 94°C durante 45 s, hibridación a 51°C durante 45 s y una elongación a 72°C durante 1min 45 s. Se realizó una extensión final a 72°C durante 10 min.

- Para rU3/fU5: una desnaturalización inicial de 95°C durante 2 min, seguida de 35 ciclos que consistían en una desnaturalización a 94°C durante 30 s, hibridación a 57°C durante 30 s y una elongación a 72°C durante 50 s. Se realizó una extensión final a 72°C durante 10 min

El producto de amplificación de la PCR se analizó mediante electroforesis en un gel de agarosa D-1 (Pronadisa, Madrid, España) al 1,5 %, con un tampón estándar TAE 1 X (EDTA Tris acetato) (Sambrook *et al.*, 1989). El ADN fue teñido con bromuro de etidio y visualizado mediante luz ultravioleta.

### **2.2.3 Caracterización del fitoplasma asociado a la enfermedad de PD en diferentes parcelas del Nordeste de España.**

En otoño del año 2000, se cogieron muestras de árboles de diferentes variedades de peral cultivadas en Cataluña, con síntomas de la enfermedad de PD. Se escogieron tanto variedades locales (Canyella, Castells, Moscatella, Cuixa de Dona y Flor d'Hivern) como variedades de cultivo más extensivo (Bartlett, Limonera, Blanquilla, Williams, Devoe, Decana, Abate Fetel, Ercolini y Tosca).

Nervios de hoja, yemas y tallo fueron procesados según el método de extracción de ADN descrito por Ahrens & Seemüller, (1992). La presencia del fitoplasma se analizó, como en el apartado anterior, por dos nested-PCR. Los productos de PCR con amplificación positiva, fueron seleccionados para un posterior análisis por RFLP. Los amplicones finales de rU3/fU5 (10 µl) fueron digeridos con la enzima de restricción *Tru9I* y los amplicones finales de fO1/rO1 fueron digeridos con las enzimas de restricción *SspI* y *RsaI*, siguiendo la metodología recomendada por MBI Fermentas (Alemania).

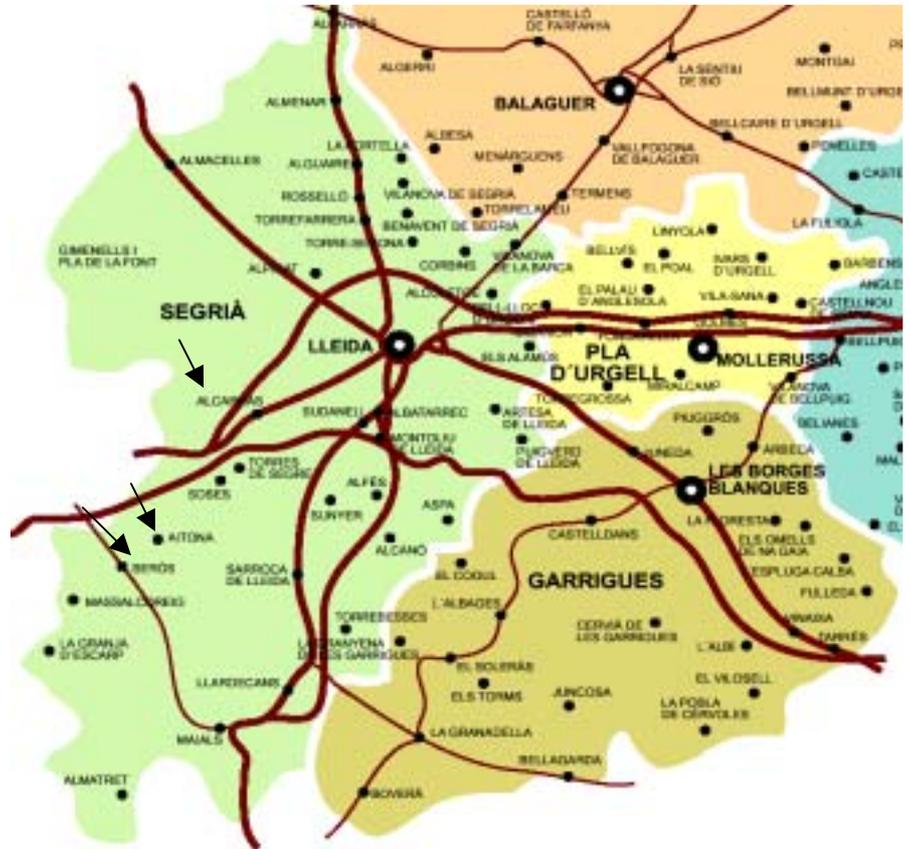
Los productos digeridos se analizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa Metaphor 3% (BMA, Rockland, USA), fueron teñidos en bromuro de etidio y visualizados con luz ultravioleta. Los perfiles se compararon con los establecidos por Seemüller *et al.*, (1998b), para analizar qué fitoplasma /as infectaban los perales.

### **2.2.4 Expresión de síntomas de PD en 3 variedades distintas de peral: Bartlett, Limonera y Blanquilla.**

Se registró la expresión de síntomas de la enfermedad de PD en tres variedades distintas de peral, Bartlett, Limonera y Blanquilla, respectivamente. Estas parcelas, localizadas en Lérida, fueron escogidas por presentar síntomas típicos de la enfermedad de PD. Se estudiaron 15 árboles enfermos de la variedad Bartlett y 14 de las variedades Limonera y Blanquilla respectivamente, de edades comprendidas entre 12 y 14 años. También se escogieron 3 perales sanos como control negativo.

Durante el periodo de Abril a Octubre del año 2000, fueron registrados mensualmente, para cada uno de los 43 árboles de las tres variedades, los síntomas presentes durante los meses en los que había hojas (Abril –Octubre), para intentar determinar si existía algún síntoma característico para cada variedad.

**Figura 2.1-** Situación de las 3 parcelas utilizadas para el estudio de la enfermedad de PD en tres variedades distintas de peral.



## 2.3 Resultados

### 2.3.1 Extensión de la enfermedad de PD en el Nordeste de España

En la Tabla 2.1 se presentan los resultados de la prospección realizada en la provincia de Lérida en el año 2000. De las 1500 parcelas observadas, alrededor de un 7% presentaron síntomas de la enfermedad de PD. Limonera, fue la variedad con el mayor número de parcelas afectadas (48 / 305), mientras que en Blanquilla tan sólo se contabilizaron 4 de 422 parcelas. Otras variedades como Conference, Ercolini, Bartlett, Williams, Alejandrina, Morettini y Devoe también presentaron síntomas de la enfermedad.

**Tabla 2.1-** Porcentaje de parcelas de diferentes variedades afectadas por la enfermedad de PD en Cataluña.

Variedad	Area cultivada (Ha)	Parcelas muestreadas *	Parcelas con síntomas de PD	% de parcelas afectadas
Limonera	2350 Ha	305 parcelas	48 parcelas	14,75%
Conference	1608 Ha	209 parcelas	12 parcelas	5,78%
Ercolini	644 Ha	83 parcelas	2 parcelas	2,40%
Blanquilla	3247 Ha	422 parcelas	4 parcelas	0,94 %
Williams, Bartlett, Devoe, Alejandrina, Morettini	3696 Ha	481 parcelas	35 parcelas	7,27%
<b>Total</b>	<b>11 545 Ha</b>	<b>1500 Parcelas</b>	<b>101 Parcelas</b>	<b>6,73%</b>

\* Una parcela corresponde aproximadamente a 1Ha.

### 2.3.2 Incidencia de la enfermedad de PD (PDI)

La incidencia de la enfermedad, por prospección visual, varió no sólo entre parcelas sino entre variedades (Tabla 2.2). La variedad más afectada fue Limonera. La PDI en las 28 parcelas de esta variedad varió entre un 8 y un 58% cuando los perales estaban injertados sobre pie franco, y entre un 32 y un 59% en perales injertados sobre membrillero. Para el resto de variedades, la incidencia fue ligeramente menor (5-35%), pero también con porcentajes diferentes según la parcela sobre la que se hizo el muestreo.

Los resultados del análisis por PCR en 10 árboles enfermos de cada parcela, indican que en el mes de Septiembre, el fitoplasma se detectó en el 62% de los árboles enfermos analizados (Tabla 2.2).

**Tabla 2.2-** Incidencia de árboles con síntomas de PD (PDI) en 45 parcelas afectadas. Detección del ADN del fitoplasma de PD mediante nested- PCR, utilizando los cebadores P1/P7 y fO1/rO1.

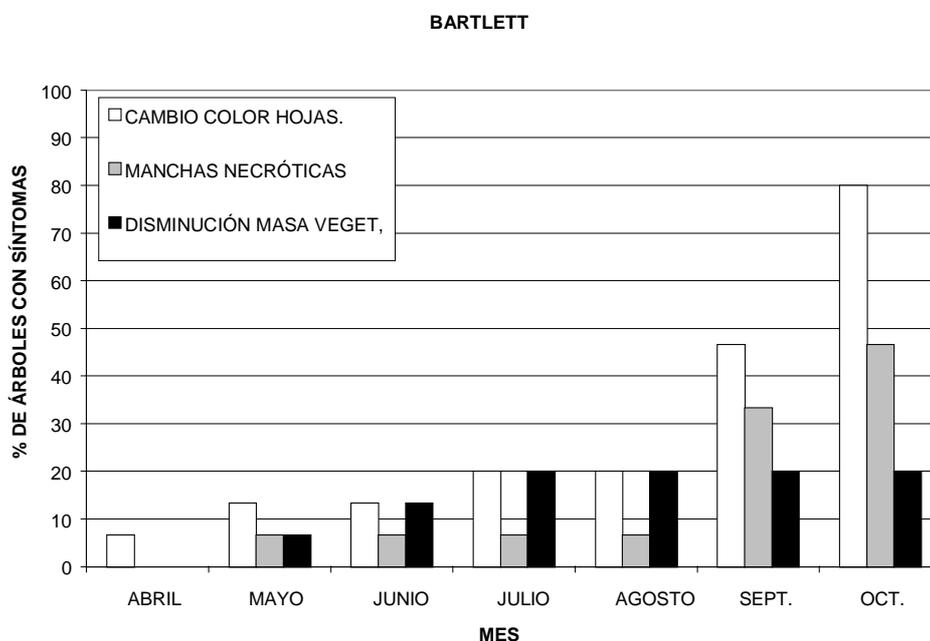
Variedad	Porta injerto	Número de parcelas	Plantas con síntomas (%)	Detección por PCR/ plantas con síntomas (%)
Bartlett	Franco	5	20-32%	75%
Bartlett	Membrillero	2	12-22%	60%
Limonera	Membrillero	16	32-59%	60%
Limonera	Franco	12	8-58%	67%
Williams	Franco	4	23-29%	65%
Williams	Membrillero	2	14-22%	60%
Blanquilla	Membrillero	4	5-35%	50%

### **2.3.3 Expresión de síntomas en 3 variedades distintas de peral: Bartlett, Limonera y Blanquilla.**

Los principales síntomas expresados en estas tres variedades fueron cambio en el color de las hojas, presencia de manchas necróticas y disminución de la masa vegetativa. Otros síntomas como filodia, escobas de bruja, etc, no fueron registrados ya que aparecían en ocasiones puntuales.

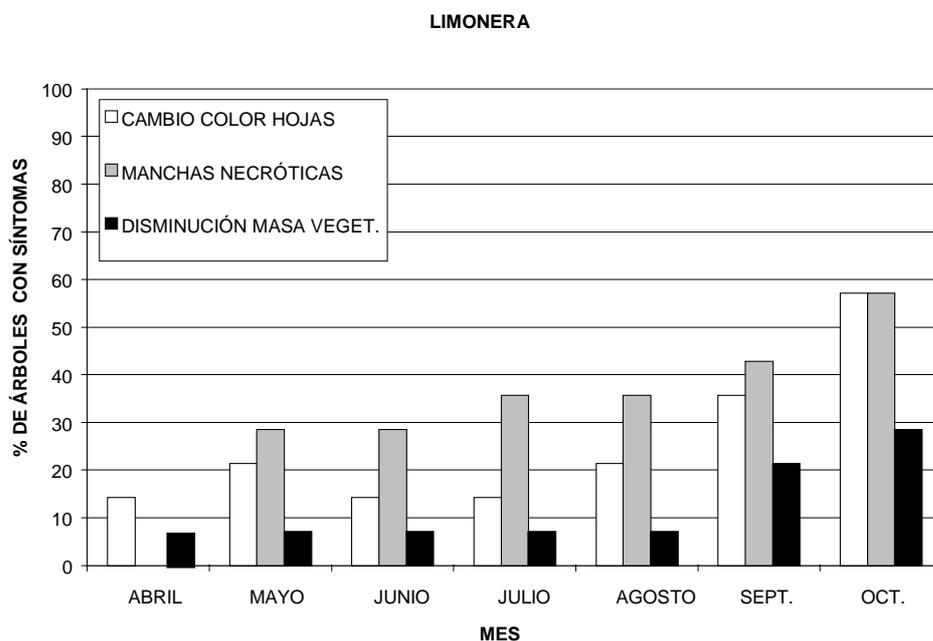
En la variedad Bartlett, el síntoma más común fue el enrojecimiento prematuro de las hojas. El número de árboles con estos síntomas fue aumentando progresivamente de un 7% en Abril, a un 80% en Octubre (Figura 2.2). El número de árboles con manchas necróticas fue menor, aunque también evidente, desde el mes de Septiembre hacia adelante,

alcanzando el 47% en el mes de Octubre. Esta variedad no se vio demasiado afectada por la disminución de la masa vegetativa, llegando tan sólo a afectar a un máximo del 20% de los árboles en Julio, y manteniéndose hasta el mes de Octubre.



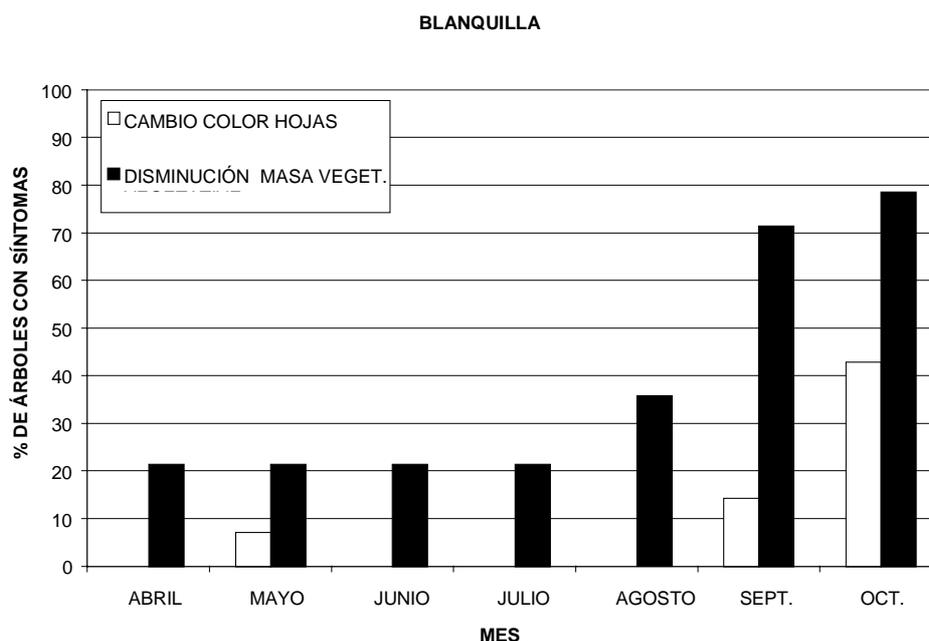
**Figura 2.2-** Evolución de la presencia de síntomas en los 15 árboles observados de la cv. Bartlett.

En la variedad Limonera, los síntomas más patentes fueron la presencia de manchas necróticas, así como un amarilleo prematuro en las hojas. El número de árboles con estos síntomas fue aumentando paulatinamente hasta Octubre (Figura 2.3). El porcentaje de árboles afectados por el cambio de color de las hojas aumentó de un 14% en Abril a un 57% en Octubre. Durante este mismo periodo, los árboles que presentaron manchas necróticas aumentaron de un 29% en Mayo, a un 57% en Octubre. La masa vegetativa no se vio demasiado afectada, alcanzando a un 29% de los árboles en Julio y manteniéndose este porcentaje hasta el mes de Octubre.



**Figura 2.3-** Evolución de la presencia de síntomas en los 14 árboles observados de la cv. Limonera.

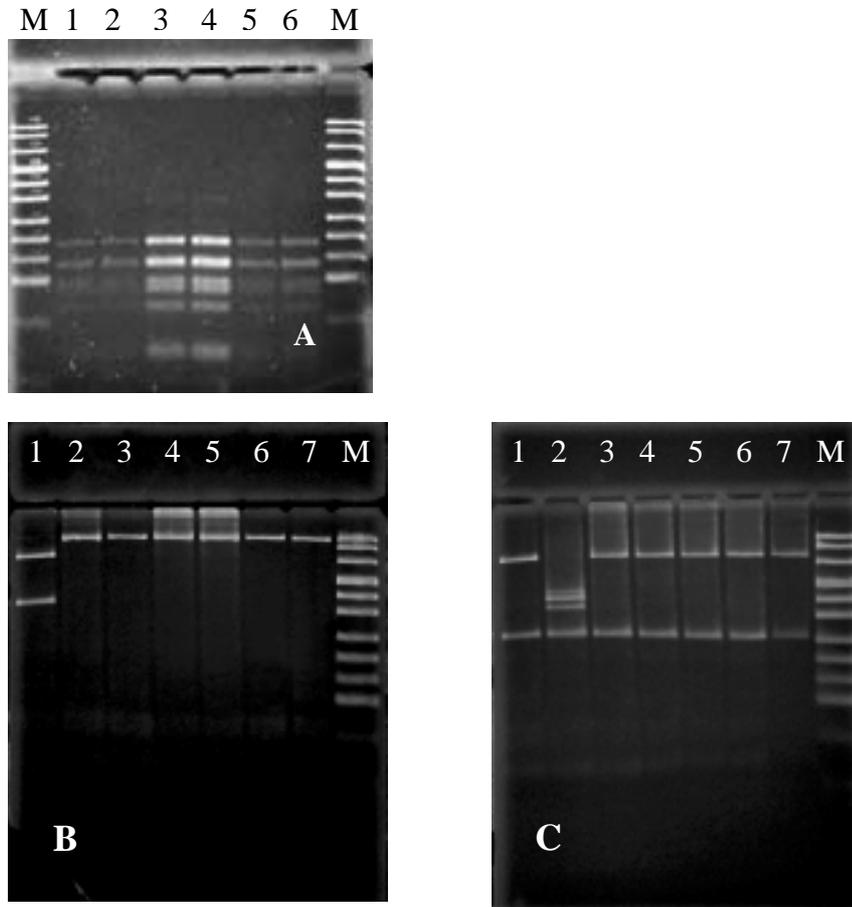
Por último, la variedad Blanquilla destacó por presentar síntomas de disminución de masa vegetativa (Figura 2.4). Ya en Mayo un 21% de los árboles presentaron esta sintomatología, alcanzando en Octubre a un 79% de los árboles. En cambio, no se detectó la presencia de manchas necróticas foliares. Los cambios de coloración en las hojas (amarilleo o enrojecimiento) fueron patentes en Octubre en un 43% de los árboles.



**Figura 2.4-** Evolución de la presencia de síntomas en los 14 árboles observados de la cv. Blanquilla.

### 2.3.4 Caracterización del fitoplasma asociado a la enfermedad de PD en diferentes parcelas del Nordeste de España.

En la Figura 2.5 están representados los resultados del análisis, mediante la técnica de RFLP, de algunas de las muestras analizadas. Los patrones de bandas, obtenidas tras la digestión de los productos amplificados, indicaron que todas las muestras analizadas pertenecían a un tipo de fitoplasma. Todos los perfiles obtenidos pertenecían al grupo AP (Figura. 2a) y más concretamente, eran idénticos al perfil del fitoplasma de PD, y distinguibles del fitoplasma de AP (Figura 2.b) y de ESFY (Figura 2c).



**Figura 2.5-** Patrón de bandas obtenido tras digerir los productos de PCR con las enzimas de restricción *Tru9I* (A), *SspI*(B) y *RsaI* (C). A, productos de PCR obtenidos mediante nested-PCR utilizando los cebadores fU5/rU3; B y C, productos de PCR utilizando los cebadores fO1/rO1. Figura A: Carriles 1-6: Muestras de ADN de diferentes variedades de peral en Cataluña. Figuras B y C: Carriles: 1- fitoplasma AP15, 2- fitoplasma ESFY, 3-7- Muestras de ADN obtenidas de diferentes variedades de perales infectados con el fitoplasma de PD. M: Marcador pUC mix, 8.

## 2.4 Discusión

En la prospección que realizamos en el Nordeste de España, menos de un 10% de las parcelas evaluadas presentaron síntomas de la enfermedad de PD. Sin embargo, la enfermedad está ampliamente distribuida, ya que muestras de todas las variedades recogidas y analizadas por PCR, dieron resultados positivos. Todos los árboles enfermos, pertenecientes tanto a variedades locales como a variedades de introducción más reciente, mostraron, mediante PCR y posterior RFLP, que estaban infectadas por un único fitoplasma, con un perfil de bandas idéntico al del fitoplasma de PD (Marcone *et al.*, 1996). No fue identificado ningún otro fitoplasma, como ha ocurrido en otras regiones de España o Hungría y donde se ha indicado la existencia del fitoplasma AP y la de Stolbur (Martinez Culebras *et al.*, 2000; Del Serrone *et al.*, 1998). El hecho que tanto las variedades más antiguas como las de introducción más reciente estuvieran infectadas por el mismo fitoplasma, sugiere la posibilidad que en Cataluña el fitoplasma de PD ha sido el único que ha causado los síntomas de esta enfermedad. Sería conveniente continuar estudiando el gen 16S rRNA y otras regiones genómicas menos conservadas, con la finalidad de averiguar si existen diferentes aislados del fitoplasma tipo PD en Cataluña. Diferencias entre aislados en el ámbito molecular, podrían explicar posiblemente las diferencias en la virulencia de la enfermedad.

Limonera fue la variedad más afectada en esta región, tanto en porcentaje de parcelas afectadas, como en número de árboles con síntomas por parcela. Estos datos confirman las observaciones hechas en estudios anteriores (Avinent *et al.*, 1997). Por el contrario, Blanquilla, la variedad más cultivada en Cataluña, (Dalmau & Iglesias, 1999) presentó menor incidencia. Estas diferencias entre variedades podrían ser atribuibles al cultivo local de Limonera, que en el pasado, fue utilizada sin previos controles de sanidad, así como a una mayor susceptibilidad de determinadas variedades a la enfermedad (McIntre *et al.*, 1979; Carraro *et al.*, 1998).

Hubo también diferencias en el porcentaje de árboles que expresaron síntomas de estar infectados, entre parcelas de una misma variedad. La incidencia de la enfermedad pudo variar en función de muchos factores, como la edad de la plantación, el estado sanitario del material utilizado, o incluso su situación geográfica, de manera que, variaciones locales en temperatura, características edafológicas, así como, en la densidad de población del insecto vector, *Cacopsylla pyri*, también podrían haber influido en la expresión de síntomas.

Durante los años 1994-1995, se observó que un importante porcentaje de parcelas en Lérida, estaban afectadas por la enfermedad de PD (Avinent *et al.*, 1997); en un 80% de las parcelas se observaron síntomas de la enfermedad. En el año 2000, según nuestras observaciones, tan sólo un 7% de las parcelas mostraron síntomas de estar afectadas por el fitoplasma. La aplicación de insecticidas y otros métodos de control, contra el vector transmisor del fitoplasma de PD, *Cacopsylla pyri* (Sarasúa *et al.*, 1999), podría haber sido la causa de esta recuperación: la disminución de la población de psilas, puede llevar a una remisión de síntomas en un periodo de 3-4 años, tal como ha sido indicado en otros trabajos (Westwood & Cameron, 1978). En el cultivo de la vid, por ejemplo, tanto en parcelas afectadas por el fitoplasma de BN, como más raramente, por FD, se ha observado una recuperación de las plantaciones con el tiempo. Estos datos confirmarían la hipótesis de recuperación de las plantaciones (Osler *et al.*, 2003). Otra posibilidad podría ser la adquisición de una mayor tolerancia a la enfermedad por determinadas variedades. Sin embargo, ambas explicaciones no implican la desaparición de la enfermedad, ya que no existe una clara correlación entre la detección del fitoplasma y la presencia de síntomas en el árbol (Seemüller *et al.*, 1998b). No obstante, sí es posible una disminución en la concentración de dicho fitoplasma (Kison & Seemüller, 2001). Así, esto nos lleva a sugerir que la enfermedad de PD está mucho más extendida que lo que nos permite estipular la inspección visual, aunque tal vez la infección sea menos severa que en el año 1994.

Por otra parte, el porta injerto utilizado no influyó en el número de parcelas que presentaron síntomas. Sin embargo, se observó que la sintomatología asociada en los árboles injertados sobre membrillero era más severa que la de los injertados sobre pie franco (dato no mostrado). Se han obtenido resultados similares en parcelas italianas (Pastore *et al.*, 1998), pero no en estudios realizados en clima atlántico (Davies *et al.*, 1998).

El análisis de la sintomatología, mostró que las tres parcelas analizadas presentaron la enfermedad de PD con características de decaimiento lento o “slow decline”. También se aprecia como, en mayor proporción Bartlett, y en menor número, Limonera y Blanquilla de forma consecutiva, tuvieron tendencia a aumentar el número de árboles con síntomas con el avance del año. La máxima expresión en las tres variedades, se produjo durante el otoño.

Mediante el análisis por separado de las características que expresaron cada una de las tres variedades frente a la enfermedad, se observó la tendencia según la variedad, de presentar uno o varios síntomas preferentes. Así por ejemplo, Bartlett manifestó como característica predominante la coloración (sobretudo de las nuevas hojas formadas),

adoptando tonalidades amarillentas y rojizas, y llegando en Octubre a los niveles más elevados. En Limonera, aunque el cambio de coloración estuvo presente durante todo el período de estudio, y aumentó en los últimos meses, tal como se ha mencionado en estudios anteriores (Avinent *et al.*, 1997), la presencia de manchas necróticas fue mayor, hasta entrado el otoño. Por último, Blanquilla, y coincidiendo también con estudios anteriores (Avinent *et al.*, 1997), no presentó apenas síntomas de cambio de coloración y manchas necróticas. Su masa vegetativa en cambio, sí se vio levemente afectada, manifestándolo durante todo el período de observación, y con mayor intensidad, en los perales injertados sobre membrillero que en los perales injertados sobre pie franco (*Pyrus communis*). Destacar que a pesar de que se contabilizaron cada uno de los árboles que presentaron esta leve disminución en la masa vegetativa como árboles con síntomas, en una prospección general, estos cambios no habrían sido percibidos ya que su aspecto general era sano.

Los resultados de este estudio sugieren que la enfermedad de PD en el nordeste de España está asociada a un único fitoplasma: el fitoplasma de PD. También se ha concluido que cada variedad presenta unos síntomas asociados característicos, lo que sería de utilidad en caso de realizar nuevas prospecciones. A pesar de ello, el análisis de la extensión de la enfermedad mediante sintomatología, no parece acercarse a valores reales de la extensión de la enfermedad. La PCR, en cambio, podría ser más adecuada para identificar el porcentaje total de árboles afectados en una prospección.

## **2.5 Bibliografía**

- Ahrens, U., E. Seemüller., 1992. Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology* 82, 828-832.
- Avinent, L., Llacer, G., Almacellas, J., Tora, R., 1997. Pear decline in Spain. *Plant Pathol.* 46, 694-698.
- Carraro, L., Loi, N., Ermacora, P., A., Osler, R., 1998. High tolerance of European plum varieties to plum leptonecrosis. *European J. Plant Pathol.* 104, 141-145.
- Dalmau, R., Iglesias, I., 1999. La fruita dolça a Lleida: evolució històrica i anàlisi de la situació actual. Institut d'estudis Llerdencs. Lleida. 203pp
- Davies, D.L., Clark, M.F., Adams, N.A., 1998. The epidemiology of pear decline in the UK. *Acta Hort.* 472, 669-672.

- Del Serrone, P., La Starza, S., Krystai, L., Kolber, M., Barba, M., 1998. Occurrence of apple proliferation and pear decline phytoplasmas in diseased pear trees in Hungary. *J. Plant Pathol.* 80 (1), 53-58.
- Deng, S., Hiruki, C., 1991. Amplification of 16s rRNA genes from culturable and nonculturable mollicutes. *J. Microbiol. Meth.* 14, 53-61.
- Kison, H., Seemüller, E., 2001. Differences in strain virulence of the European stone fruit yellows phytoplasma and susceptibility of stone fruit trees on various rootstocks to this pathogen. *J. Phytopathol.* 149, 533-541.
- Lorenz, K.-H., Schneider, B., Ahrens, U., Seemüller, E., 1995. Detection of the apple proliferation and pear decline phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and nonribosomal DNA. *Phytopathology* 85, 771-776.
- Marcone, C., Ragozzino, A., Seemüller, E., 1996. European stone fruit yellows phytoplasma as the cause of peach vein enlargement and other yellows and decline diseases of stone fruits in southern Italy. *J. Phytopathol.* 144, 559-564.
- Martinez-Culebras, P.V., Abad-Campos, P., Jordá, C., 2000. Molecular identification of phytoplasmas from fruit trees. *Proceedings of the 5th Congress of the European Foundation for Plant Pathology*, 192-195.
- McIntyre, J.L., Schneider, H., Lacy, G.H., Doods, J.A., Walton, G.S., 1979. Pear decline in Connecticut and response of diseased trees to oxytetracycline infusion. *Phytopathol* 69, 955-958.
- Mutton, P., Boccalon, W., Bressan, S., Coassin, C., Colautti, M., Del Cont, B.D., Floreani, A., Zucchiatti, D., Pavan, F., Mucignat, D., Frausin, C., Antoniazzi, P., Stefanelli, G., Villani, A., 2002. Legno nero della vite in vigneti di Chardonnay del Friuli-Venezia Giulia. *Inf. Fitopatol.* 1, 52-59.
- Németh, M., 1986. *Virus, Mycoplasma and Rickettsia diseases of fruit trees.* Martinus Nijhoff and W. Junk ed. Budapest. 841pp
- Osler, R., Carraro, L., Ermacora, P., Ferrini, F., Loi, F., Loschi, A., Martini, M., mutton, P.B., Refatti, E., 2003. Rouging: A controversial practice to eradicate Grape yellows caused by phytoplasmas. 14<sup>th</sup> Meeting of the international Council for the Study of Virus and Virus-like diseases of the Grapevine (ICGV). September 12-17, Locorotondo, Italy.
- Pastore, M., Santonastaso, M., Lee, I-M., Vibio, M., Bertaccini, A., La Cara, F., 1998. Susceptibility to phytoplasma infection of three pear varieties grafted on different rootstocks. *Acta Hort.* 472, 673-680.
- Rallo, L., 1973. Decaimiento del peral en plantaciones del Valle del Ebro. *An. INIA/ Ser protecci3n vegetal* 3, 147-205.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: a Laboratory 125 Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.

- Sarasúa, M.J., Avila, J., Artigues, M., Jauset, A.M., 1999. Estrategia de control de la psylla del peral, *Cacopsylla pyri* (L.), para el desarrollo de un programa de control integrado en peral. *Phytoma España* 114, 86-88.
- Schneider, B., Seemüller, E., Smart, C. D., Kirkpatrick, B. C., 1995. Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas. In: *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmaology*, Vol. 2. Ed. by Razin, S.; Tully, J. G. New York: Academic Press, pp. 369-380.
- Schneider, H., 1970. Graft transmission and host range of pear decline causal agent. *Phytopathol.* 60, 204-207.
- Seemüller, E., Lorenz, K.H., Lauer, U., 1998a. Pear Decline Resistance in *Pyrus communis* rootstocks and progenies of wild and ornamental *Pyrus* taxa. *Acta Hort.* 472, 681-690.
- Seemüller, E., Marcone, C., Lauer, U., Ragozzino, A., Göschl, M., 1998b. Current status of molecular classification of the Phytoplasmas. *J. Plant Pathol.* 80, 3-26.
- Westwood, M.N., Cameron, H.R., 1978. Environment-induced remission of pear decline symptoms. *Plant Dis. Repr.* 62, 176-179.
- Zucchetto, C.A., 1998. Epidemiologia ed evoluzione dei sintomi della Flavescenza dorata nell'area del Prosecco. Thesis of Bachelor Degree, pp. 61.

# 3

## **Detección estacional del fitoplasma del Decaimiento del peral mediante nested-PCR, en tres variedades distintas de peral.**

### **Resumen**

Se ha estudiado mensualmente y durante 2 años consecutivos la detección del fitoplasma del Decaimiento del peral (PD) en tres variedades distintas de peral: Bartlett, Limonera y Blanquilla. La presencia del fitoplasma se ha examinado mediante la técnica de nested-PCR en un total de 43 árboles. Cada variedad presentó un patrón de detección diferente. Sin embargo, en los tres casos, la máxima detección del fitoplasma fue alcanzada en Diciembre y este alto porcentaje se mantuvo durante el invierno. En primavera, coincidiendo con el desarrollo de nuevos brotes, los porcentajes de detección disminuyeron a los niveles más bajos registrados.

Paralelamente, en este estudio se ha analizado qué parte de la planta (nervios, yemas o tallo) era la más adecuada para realizar una detección del fitoplasma mediante PCR. Se obtuvo la detección más fiable en tallo. La relación existente entre detección por PCR y síntomas presentes en el árbol también ha sido evaluada. Los resultados indicaron que la técnica de nested-PCR era más adecuada que la observación de síntomas para analizar si un árbol estaba infectado.

Finalmente, se ha examinado el estado funcional del fitoplasma de PD durante el invierno, mediante transmisión del fitoplasma por injerto a perales sanos. Los resultados demostraron que el fitoplasma puede permanecer en estado funcional en la parte aérea del árbol durante la fase de hibernación, hecho a tener en cuenta, debido a que la multiplicación vegetativa suele realizarse a partir de brotes de invierno.

Palabras clave: detección, injerto, nested-PCR, *Pyrus communis*, transmisión

Publicado en: *Plant Pathology* 52, 513-520.

### 3.1 Introducción

La técnica de PCR, gracias a su sensibilidad, es hasta ahora la más utilizada para analizar la infección de fitoplasmas en plantas, mediante la detección de su ADN (Deng & Hiruki, 1991; Jarausch *et al.*, 1994; Lorenz *et al.*, 1995, Smart *et al.*, 1996; Marzachi *et al.*, 1999; Waterworth & Mock, 1999; Batlle *et al.*, 2000, Mengling *et al.*, 2002). Sin embargo debido a que los fitoplasmas se distribuyen en el árbol de forma irregular y se encuentran en bajas concentraciones (Daire *et al.*, 1992), cuando los resultados de la PCR son negativos, existe la posibilidad que sea debido a que no se haya recogido material de la parte del árbol infectada. Además en la planta existen una serie de sustancias que varían en su concentración a lo largo del año y que pueden actuar como inhibidores de la PCR (Maliyakal, 1992; Green *et al.*, 1999). Por este motivo, para certificar material vegetal, o ante la necesidad de hacer prospecciones para determinar la extensión de un determinado fitoplasma, sería conveniente tener un conocimiento previo de la muestra a tratar, saber cuál es la distribución del fitoplasma en el árbol, el material más adecuado para detectarlo, así como la época idónea para obtener resultados fiables.

Los estudios previos de detección del fitoplasma de PD en peral durante el año se han realizado en un clima centroeuropeo, con condiciones climáticas diferentes a la de los países mediterráneos, y mediante la técnica de DAPI (Seemüller *et al.*, 1984). En estas circunstancias, la mayor detección de ADN fitoplasmático se obtuvo en verano-otoño, y en Diciembre los porcentajes bajaron.

En plantas leñosas como manzanos, melocotoneros y perales, la presencia de fitoplasmas en la parte aérea del árbol está condicionada por el estado del floema (Stoddard, 1947; Hildebrand, 1953; Braun & Sinclair, 1976; Schaper & Seemüller, 1982; Seemüller *et al.*, 1984). Estudios de transmisión del fitoplasma por injerto, sugieren que los fitoplasmas hibernan en las raíces de los árboles, lo que se traduce en transmisiones durante el verano y el otoño (Griggs, 1965; Schneider, 1970; Schaper, 1981), pero no durante el invierno (Blodget *et al.*, 1963; Shalla *et al.*, 1964; Seidl & Komarkova, 1973). Esta ausencia de transmisión podría ser debida a la degeneración de los tubos cribosos durante esta época (Evert, 1960; Evert, 1963). Sin embargo, estudios recientes realizados en *Prunus* con ESFY han demostrado la existencia de fitoplasmas en estado funcional en la parte aérea del árbol durante el invierno (Seemüller *et al.*, 1998).

Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, el principal objetivo de este estudio ha sido, determinar cuál era la mejor época del año para obtener una detección fiable del fitoplasma de PD. Para ello se ha analizado la presencia del fitoplasma en la parte aérea del árbol, fácil de manipular, mediante la técnica de nested-PCR. La relación entre la detección mediante PCR y la sintomatología expresada por árboles infectados, también ha sido evaluada.

Por otra parte, se ha estudiado cuál era la parte del árbol idónea para analizar la presencia de la enfermedad, así como la existencia de posibles diferencias en la detección según la variedad utilizada. Finalmente, se ha estudiado la viabilidad del fitoplasma en el floema de la parte aérea durante el invierno, mediante transmisión del fitoplasma por injerto, a planta sana.

## **3.2 Material y Métodos**

### **3.2.1 Detección estacional del fitoplasma de PD mediante PCR en tres variedades distintas de peral**

#### *3.2.1.1 Material vegetal*

Durante dos años consecutivos se examinó mensualmente y mediante la técnica de nested-PCR, el porcentaje de árboles enfermos en que se detectaba el fitoplasma de PD. Se utilizaron los 43 árboles infectados y los 3 árboles sanos del apartado 2.2.4. Se recogieron muestras mensualmente desde Junio del año 2000 a Mayo de 2001, y cada tres meses de Junio de 2001 a Mayo de 2002. En cada muestreo, se recogieron entre 20-30 ramas de todas las partes de cada uno de los árboles, para evitar falsos negativos, por la distribución irregular del fitoplasma. Durante el primer año, las muestras se dividieron en el laboratorio en tallo, yemas (excepto en Abril) y nervios; estos últimos sólo durante el periodo de Abril-Noviembre. Durante el segundo año, sólo se analizó el tallo.

#### *3.2.1.2 Detección del fitoplasma*

Se realizó una extracción del ADN según la metodología descrita por Ahrens & Seemüller (1992). La presencia de ADN del fitoplasma de PD se examinó mediante la técnica de nested-PCR, con los cebadores universales para fitoplasmas, P1/P7 (Deng & Hiruki, 1991; Schneider *et al.*, 1995) y los cebadores específicos para el grupo AP, fO1/

rO1 (Lorenz *et al.*, 1995). Los análisis por PCR se repitieron 3 veces y las condiciones fueron las explicadas en el apartado 2.2.2.1.

### 3.2.1.3 Tratamiento estadístico

Las medias de detección de las tres variedades, obtenidas a partir de los datos acumulados de los dos años consecutivos, se analizaron mediante el paquete estadístico SAS (SAS Institute Program, versión 6.12) a través del procedimiento GLM (General Lineal Model). También se compararon las medias de detección entre las diferentes estaciones del año sin tener en cuenta el factor variedad. Las medias fueron comparadas mediante el test múltiple de Duncan.

Los resultados de las tres partes estructurales muestreadas durante el período de Mayo a Noviembre, fueron procesados para analizar si existía alguna relación entre las variables localización o tiempo, con detección, así como alguna relación de orden superior (interacción entre las dos variables y detección), mediante un análisis Log-lineal. Este procedimiento permite hacer un análisis sistemático de tablas de contingencia múltiples, así como calcular la interacción entre las variables.

### **3.2.2 Correlación entre expresión de síntomas y detección por PCR**

Para este estudio se utilizaron los datos de sintomatología obtenidos en el apartado 2.3.3. Para cada una de las 3 variedades estudiadas, se analizó la relación existente entre las variables: “Número de árboles que presentan síntomas” y “Número total de árboles que amplifican para el fitoplasma de PD mediante PCR (con o sin síntomas)”; así como también la relación entre las variables: “número de árboles con síntomas” y “árboles con síntomas y que amplifican para el fitoplasma de PD mediante PCR”. Correlaciones con  $P \leq 0,05$  fueron consideradas como significativas. Los datos obtenidos durante Noviembre no fueron utilizados debido a que los 3 perales sanos en este periodo ya empezaron a mostrar síntomas propios de la senescencia.

### **3.2.3 Transmisión del fitoplasma de PD mediante injerto de yemas infectadas a perales sanos durante el invierno**

Durante el período de invierno (Febrero) de los años 2001 y 2002, se injertaron yemas, procedentes de un árbol cv. Bartlett, infectadas por el fitoplasma de PD, sobre 9 (en 2001) y 12 (en 2002) pies de *Pyrus communis* OHF 333, de 2 años de edad, que procedían de cultivo *in vitro*. Las yemas procedían de ramas en las que previamente se había detectado el fitoplasma por PCR. Paralelamente, en ambos años, se injertaron 6 árboles con yemas sanas como controles negativos.

Una vez injertados, los perales fueron mantenidos en invernadero libre de insectos, a Tª ambiente. La detección del fitoplasma, para determinar si había habido transmisión en los árboles injertados, se realizó periódicamente mediante la técnica de PCR a partir de una extracción de ADN de nervios de hoja.

## **3.3 Resultados**

### **3.3.1 Detección del fitoplasma de PD a lo largo del año**

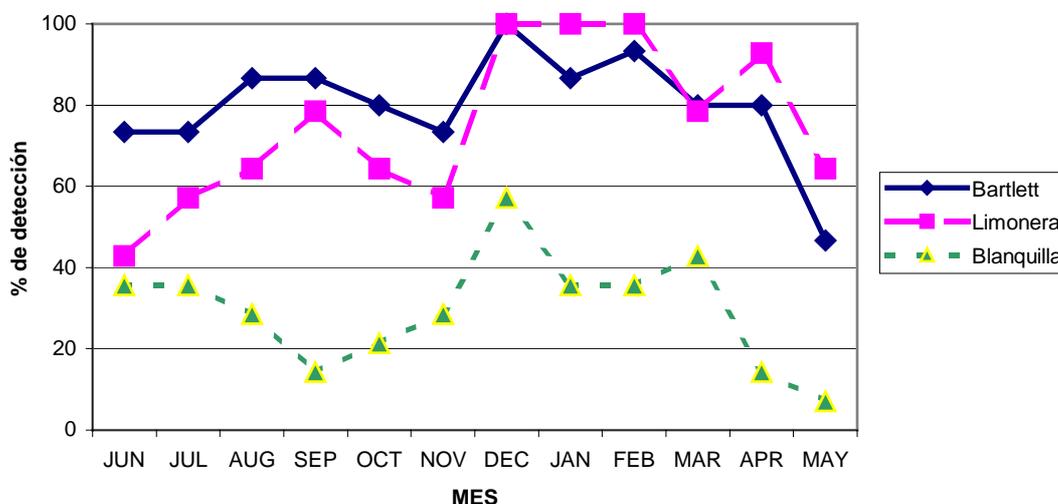
En las Tablas 3.1, 3.2 y 3.3 se encuentran los resultados obtenidos a lo largo del año, de la detección individual por nested-PCR del fitoplasma de PD, para los 43 árboles analizados. En la Figura 3.1 está representado el porcentaje mensual de árboles en los que se detectó el fitoplasma de PD.

Durante el periodo de Junio a Diciembre, en las variedades Bartlett y Limonera, el número total de árboles que dieron amplificación positiva fue aumentando progresivamente, con la excepción de los meses de Octubre y Noviembre. Los mejores porcentajes se alcanzaron en Diciembre (100%), manteniéndose elevados hasta el mes de Abril. En cambio, en Mayo se observó un descenso significativo.

En la variedad Blanquilla, los porcentajes de detección fueron más bajos que en las dos variedades anteriores, y no se observó una tendencia clara a aumentar en el tiempo este porcentaje. Durante el mes de Diciembre se obtuvieron los porcentajes de detección más altos (Tabla 3.3, Figura 3.1). En esta variedad el descenso más brusco en la detección se inició en Abril.

Durante el segundo año, se recogieron muestras trimestralmente, para comprobar los resultados del primer año. Los valores obtenidos mostraron el mismo patrón de detección

del fitoplasma que en el primer año (Tabla 3.4), alcanzándose también en Diciembre los mayores valores de detección en las tres variedades.



**Figura 3.1-** Evolución anual de la detección del ADN del fitoplasma de PD, de Junio de 2000 a Mayo de 2001, en tres variedades distintas de peral. Porcentaje de árboles en lo que se detectó el fitoplasma mediante nested-PCR sobre un total de 15, 14 y 14 árboles enfermos de las variedades Bartlett, Limonera y Blanquilla respectivamente.

Se analizó la relación existente entre detección por variedad-mes y variedad-año. El análisis mostró que no existían interacciones ( $P = 0,078$  y  $P = 0,788$  respectivamente), de manera que usando los datos acumulativos obtenidos mensualmente durante los dos años, se obtuvieron diferencias significativas en los porcentajes medios de detección del fitoplasma de PD, entre las 3 variedades estudiadas (Bartlett 85 a, Limonera 74 b y Blanquilla 40 c).

Por otro lado, cuando fueron analizadas de manera conjunta los resultados de PCR en función de la estación del año, representadas por Junio, Septiembre, Diciembre y Marzo, se detectaron diferencias significativas entre ellas, obteniéndose en Diciembre, la detección más elevada (Tabla 3.4).

Detección estacional del fitoplasma en el árbol

**Tabla 3.1-** Detección mensual del ADN del fitoplasma de PD en nervios de hoja, yemas y tallo, desde Junio de 2000 hasta Mayo de 2001, mediante la técnica de nested-PCR. Fueron analizados 14 árboles infectados de la variedad Bartlett.

Variedad	Fecha de muestreo																																									
<i>BARTLETT</i>	JUNIO			JULIO			AGOSTO			SEPTIEM.			OCTUBRE			NOVIEMB.			DICIEMB.			ENERO			FEBRERO			MARZO			ABRIL			MAYO								
	N	Y	T	N	Y	T	N	Y	T	N	Y	T	N	Y	T	N	Y	T	N	Y	T	N	Y	T	N	Y	T	N	Y	T	N	Y	T	N	Y	T	N	Y	T	N	Y	T
1	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	nt	+	+	nt	+	+	nt	+	+	nt	+	+	nt	+	+	-	nt	+	-	-	-			
2	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	nt	-	+	nt	+	+	nt	+	+	nt	+	+	nt	+	+	-	nt	-	-	-	+			
3	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	nt	+	+	nt	+	+	nt	+	+	nt	+	+	nt	+	+	-	nt	+	-	-	-			
4	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	nt	+	+	nt	+	+	nt	+	+	nt	+	+	nt	+	+	-	nt	+	-	-	+			
5	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	nt	+	+	nt	+	+	nt	+	+	nt	+	+	nt	+	+	-	nt	+	-	-	+			
6	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	nt	+	+	nt	+	-	nt	+	+	nt	+	+	+	nt	+	-	-	-						
7	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	nt	+	+	nt	-	+	nt	-	-	nt	+	+	-	nt	+	-	-	-						
8	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	nt	+	+	nt	-	-	nt	+	+	nt	-	-	-	nt	+	-	+	-						
9	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	nt	+	+	nt	+	+	nt	+	+	nt	+	+	nt	-	-	-	nt	+	-	-	+			
10	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	nt	+	+	nt	+	+	nt	+	+	nt	+	+	nt	+	+	-	nt	+	-	-	+			
11	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	nt	-	+	nt	+	+	nt	+	+	nt	+	+	nt	+	+	-	nt	+	-	-	-			
12	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	nt	+	+	nt	+	+	nt	+	+	nt	+	+	nt	+	-	-	nt	+	-	-	+			
13	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	nt	-	+	nt	+	-	nt	-	+	nt	+	+	-	nt	+	-	-	-						
14	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	nt	+	+	nt	-	-	nt	+	-	nt	-	-	-	nt	-	-	-	-						
15	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nt	+	+	nt	+	+	nt	+	+	nt	+	+	nt	-	+	-	nt	-	-	-	-			

NT: Muestras no analizadas.  
 N:nervios; Y:Yemas; T:tallo

Detección estacional del fitoplasma en el árbol

**Tabla 3.2-** Detección mensual del ADN del fitoplasma de PD en nervios de hoja, yemas y tallo, desde Junio de 2000 hasta Mayo de 2001, mediante la técnica de nested-PCR. Fueron analizados 14 árboles infectados de la variedad Limonera.

Variedad	Fecha de muestreo																																									
	JUNIO			JULIO			AGOSTO			SEPTIEM.			OCTUBRE			NOVIEMB.			DICIEMB.			ENERO			FEBRERO			MARZO			ABRIL			MAYO								
LIMONERA	N	Y	T	N	Y	T	N	Y	T	N	Y	T	N	Y	T	N	Y	T	N	Y	T	N	Y	T	N	Y	T	N	Y	T	N	Y	T	N	Y	T	N	Y	T	N	Y	T
1	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	nt	+	+	nt	+	+	nt	-	+	nt	-	-	-	nt	+	-	-	+						
3	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	nt	+	+	nt	-	+	nt	+	+	nt	+	+	-	nt	+	-	-	+						
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	nt	-	+	nt	+	+	nt	+	+	nt	+	+	-	nt	+	-	-	-						
5	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nt	+	+	nt	-	+	nt	+	+	nt	+	+	-	nt	+	-	+	+						
6	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	nt	+	+	nt	+	+	nt	+	+	nt	-	+	-	nt	+	-	-	-						
7	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	nt	-	+	nt	-	+	nt	+	-	nt	-	-	-	nt	+	-	-	+						
8	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	nt	+	+	nt	-	+	nt	+	+	nt	+	+	-	nt	+	-	-	-						
9	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	nt	+	+	nt	+	+	nt	+	+	nt	+	+	-	nt	+	-	-	+						
10	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nt	+	+	nt	+	-	nt	+	+	nt	+	+	-	nt	+	-	-	+						
11	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	nt	+	+	nt	-	+	nt	-	+	nt	+	+	-	nt	-	-	-	-						
12	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	nt	+	+	nt	-	+	nt	+	+	nt	+	+	-	nt	+	-	-	-						
13	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	nt	+	+	nt	+	+	nt	+	+	nt	-	-	-	nt	+	-	-	+						
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	nt	+	+	nt	+	+	nt	+	+	nt	+	+	-	nt	+	-	-	+						
15	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	nt	+	+	nt	+	+	nt	-	+	nt	-	+	nt	+	+	-	nt	+						

NT: Muestras no analizadas  
 N:nervios; Y:Yemas; T:tallo

Detección estacional del fitoplasma en el árbol

**Tabla 3.3-** Detección mensual del ADN del fitoplasma de PD en nervios de hoja, yemas y tallo, desde Junio de 2000 hasta Mayo de 2001, mediante la técnica de nested-PCR. Fueron analizados 14 árboles infectados de la variedad Blanquilla.

Variedad	Fecha de muestreo																																						
	JUNIO			JULIO			AGOSTO			SEPTIEM.			OCTUBRE			NOVIEMB.			DICIEMB.			ENERO			FEBRERO			MARZO			ABRIL			MAYO					
BLANQUILLA	N	Y	T	N	Y	T	N	Y	T	N	Y	T	N	Y	T	N	Y	T	N	Y	T	N	Y	T	N	Y	T	N	Y	T	N	Y	T	N	Y	T	N	Y	T
1	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	nt	-	+	nt	-	-	nt	-	-	nt	-	-	-	nt	-	-	-	-			
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	nt	-	-	nt	-	-	nt	-	+	nt	-	-	-	nt	-	-	-	+			
4	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	nt	-	+	nt	-	-	nt	-	-	nt	-	-	-	nt	-	-	-	-			
5	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	nt	-	+	nt	-	+	nt	-	-	nt	+	-	-	nt	-	-	-	-			
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	nt	-	+	nt	+	-	nt	+	-	nt	-	-	-	nt	-	-	-	-			
7	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	nt	-	-	nt	-	+	nt	-	-	nt	-	+	-	nt	+	-	-	-			
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	nt	+	-	nt	-	-	nt	-	+	nt	+	+	-	nt	-	-	-	-			
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nt	-	-	nt	-	-	nt	-	-	nt	-	-	-	nt	-	-	-	-			
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nt	+	+	nt	-	-	nt	-	+	nt	-	-	-	nt	-	-	-	-			
11	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	nt	-	-	nt	-	-	nt	-	-	nt	-	-	-	nt	-	-	-	-			
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nt	+	+	nt	+	-	nt	-	-	nt	-	+	-	nt	-	-	-	-			
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nt	-	-	nt	-	-	nt	-	-	nt	-	+	-	nt	-	-	-	-			
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	nt	-	+	nt	-	+	nt	+	-	nt	-	+	-	nt	-	-	-	-			
15	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nt	-	-	nt	-	-	nt	-	-	nt	-	-	+	nt	-	-	-	-			

NT: Muestras no analizadas  
 N:nervios; Y:Yemas; T:tallo

**Tabla 3.4-** Detección del fitoplasma de PD (%) mediante nested-PCR en perales infectados de tres variedades distintas. La detección se realizó durante 2 años consecutivos, y los porcentajes de detección fueron comparados estacionalmente. Los porcentajes medios de detección se compararon mediante el test de Duncan ( $P \leq 0,05$ )

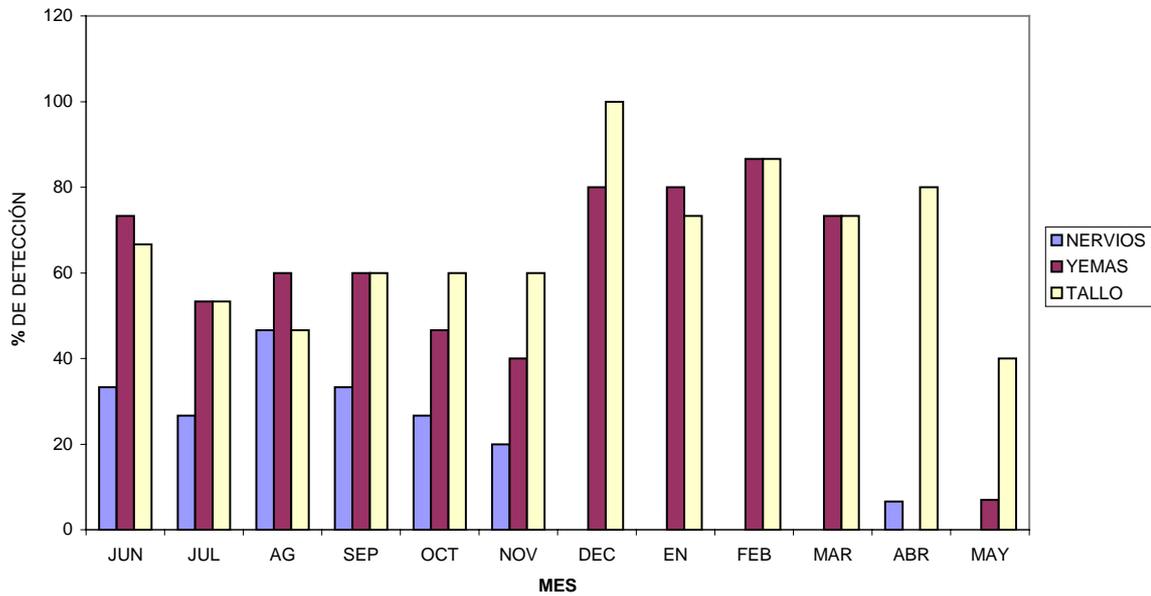
Variedad	Detección mensual (%) <sup>1</sup>			
	Jun.	Sept.	Dic.	Marzo
	2001			
Bartlett	73	87	100	80
Limonera	43	79	100	79
Blanquilla	36	14	57	43
	2002			
Bartlett	53	100	100	87
Limonera	36	71	100	86
Blanquilla	29	43	64	36
Media de detección mensual <sup>2</sup>	45 c	66 b	87a	68 b

<sup>1</sup> Porcentaje de detección del fitoplasma de PD en 15 árboles de la variedad Bartlett, y 14 de las variedades Limonera y Blanquilla respectivamente.

<sup>2</sup> Media mensual (Junio, Septiembre, Diciembre o Marzo) de detección del fitoplasma de PD en todos los árboles durante 2 años consecutivos.

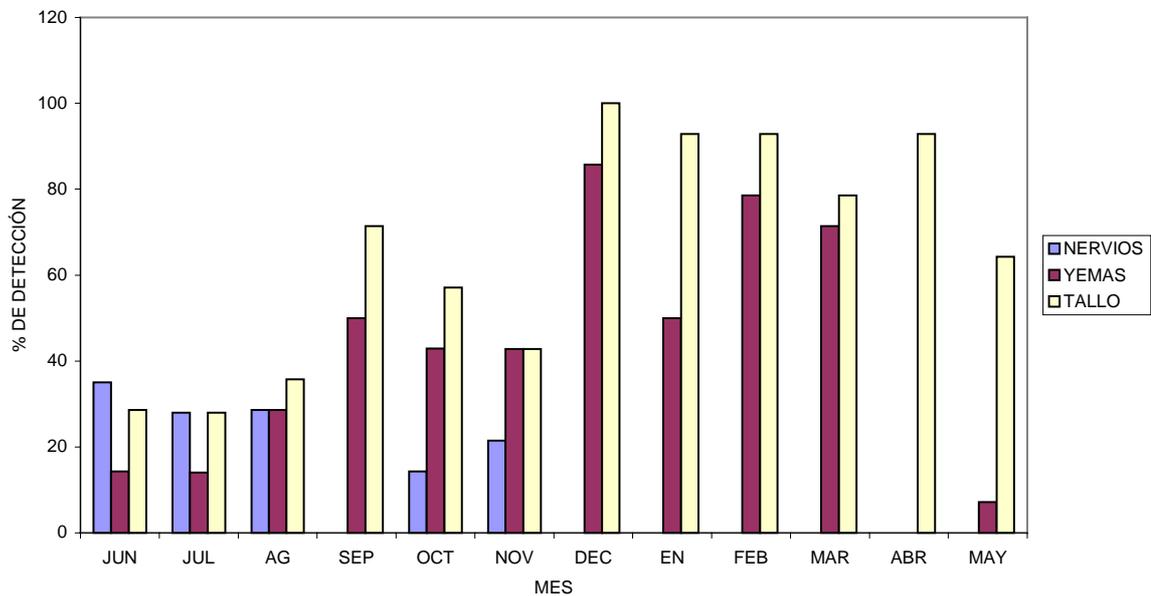
### 3.3.2 Estudio de la detección de PD en diferentes partes de la planta

Durante los meses de Mayo a Noviembre, cuando las tres partes del árbol fueron muestreadas, Bartlett mostró unos porcentajes de detección comparables en yemas y tallo, con la excepción del mes de Mayo, donde la detección del ADN del fitoplasma en tallo fue mucho mayor que en yemas. Estos porcentajes fueron siempre superiores a los obtenidos en los nervios de hoja (Figura 3.2).



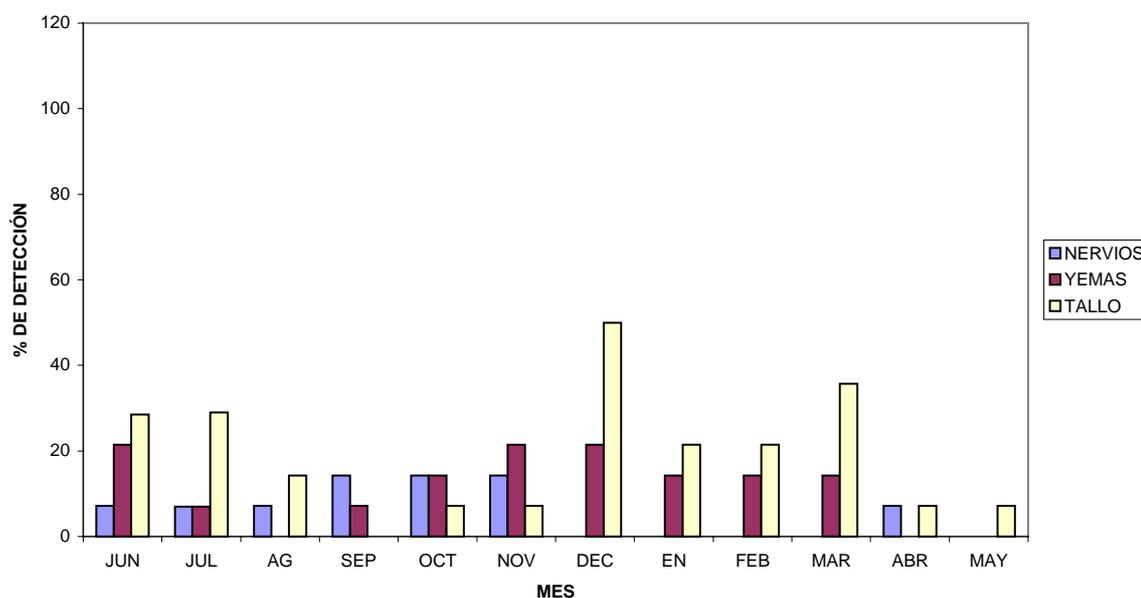
**Figura 3.2-** Detección mensual del fitoplasma de PD mediante nested-PCR en nervios, yemas y tallo de la variedad Bartlett.

En Limonera, los porcentajes de detección fueron variando durante los meses analizados. El tallo presentó unos porcentajes igual o mayores que en las otras dos partes estructurales, con excepción del mes de Junio, donde se detectó el mayor número de árboles con fitoplasmas en los nervios de las hojas, y el mes de Julio en el que en nervios y tallo se detectó la misma proporción (Figura 3.3).



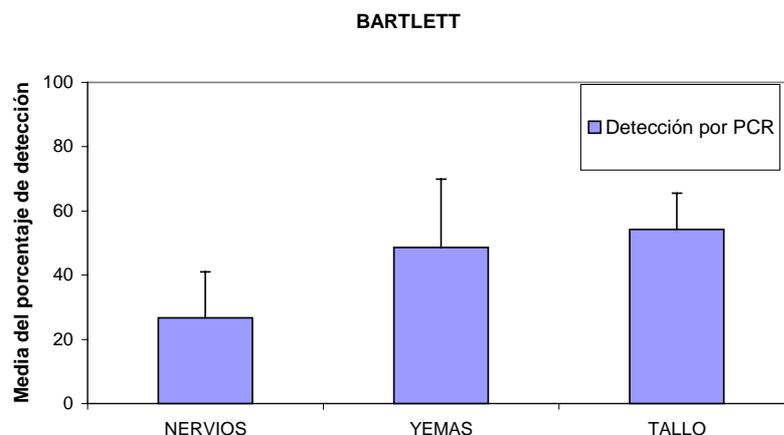
**Figura 3.3-** Detección mensual del fitoplasma de PD mediante nested-PCR en nervios, yemas y tallo de la variedad Limonera

Por último, en la variedad Blanquilla, los porcentajes fueron muy variables, y ninguna de las tres partes destacó por presentar un mayor número de detección del fitoplasma de forma constante. Sin embargo, en determinados meses como Junio, Julio, Agosto y Mayo en tallo los porcentajes de detección fueron superiores a los otras dos partes estructurales analizadas (Figura 3.4).



**Figura 3.4-** Detección mensual del fitoplasma de PD mediante nested-PCR en nervios, yemas y tallo de la variedad Blanquilla.

El análisis log-lineal realizado durante el período de Mayo a Noviembre, mostró que para la variedad Bartlett, la detección era dependiente tanto de la localización (parte de la planta) como del tiempo ( $P < 0,05$ ), no habiendo interacción entre estas dos variables ( $P = 0,72$ ). De esta forma, analizando las medias de los porcentajes de detección, en el tallo se alcanzó la proporción más elevada de detección durante este periodo, seguida de yemas y nervios respectivamente (24% en nervios, 41% en yemas y 57% en tallo).



**Figura 3.5-** Media del porcentaje de detección por nested-PCR, en nervios yemas y tallo de la variedad Bartlett

En Limonera, hubo una interacción entre localización y tiempo ( $P < 0,05$ ), de forma que la mayor detección en una u otra parte estructural, dependió del mes analizado. Por tanto, de Agosto a Noviembre, el porcentaje de detección en tallo fue superior nervios e igual o superior a los porcentajes obtenidos en yemas (Figura 3.3).

En Blanquilla, durante el periodo de Mayo a Noviembre, la detección fue dependiente del momento en el que se realizó ( $P < 0,01$ ), pero no de la parte estructural analizada ( $P = 0,10$ ) y tampoco existió una interacción entre estas variables. Por tanto, el porcentaje de detección no varió demasiado si se analizaban yemas, nervios o tallo, y en cambio la detección total de árboles positivos sí dependió del mes analizado.

Durante los meses de Diciembre a Abril, tan solo fueron recolectados yemas y tallo. En Bartlett, los porcentajes de detección fueron similares para ambas partes estructurales. Sin embargo, Limonera y Blanquilla presentaron mayor detección en tallo que en yemas.

### 3.3.3 Correlación entre expresión de síntomas y detección por PCR

La correlación entre “árboles con síntomas” y “árboles con síntomas que amplifican para el fitoplasma de PD mediante PCR” (Tabla 3.5), fue positiva (Bartlett  $r = 0,95$ ; Limonera  $r = 0,84$ ). De esta forma, la expresión de síntomas en árbol estuvo ligada, en un porcentaje muy elevado de casos, a una amplificación positiva mediante PCR. En la variedad Blanquilla, ambas variables fueron independientes ( $r = 0,45$ ).

En cambio, en las tres variedades, no existió correlación entre “número de árboles con síntomas” y “número total de árboles detectados por PCR (con o sin síntomas)” (Tabla 3.5), (Bartlett  $r = 0,44$ ; Limonera  $r = -0,11$ ; Blanquilla  $r = 0,09$ ).

**Tabla 3.5-** Número de árboles con síntomas característicos de la enfermedad de PD, registrados a lo largo del año en tres variedades de peral. Detección del ADN del fitoplasma de PD mediante PCR. nt: Muestras con síntomas no registrados, debido a la ausencia de hojas en el árbol.

Detección estacional del fitoplasma en el árbol

Mes	Árboles con	Árboles con síntomas	Árboles sin	Árboles sin síntomas	Detección total
	síntomas	PCR +	síntomas	PCR +	
<b>BARTLETT</b>					
Abril	1	1	14	11	12
Mayo	4	3	11	4	7
Junio	4	4	11	7	11
Julio	5	5	10	6	11
Agosto	5	5	10	8	13
Septiembre	8	8	7	5	13
Octubre	12	12	3	0	12
Noviembre	nt	Nt	nt	nt	11
Diciembre	nt	Nt	nt	nt	15
<b>LIMONERA</b>					
Abril	3	3	11	10	13
Mayo	4	3	10	6	9
Junio	4	2	10	4	6
Julio	5	1	9	7	8
Agosto	5	3	9	6	9
Septiembre	6	6	8	5	11
Octubre	8	7	6	2	9
Noviembre	nt	Nt	nt	nt	8
Diciembre	nt	Nt	nt	nt	14
<b>BLANQUILLA</b>					
Abril	3	0	11	2	2
Mayo	3	0	11	1	1
Junio	3	1	11	4	5
Julio	3	3	11	2	5
Agosto	5	2	9	1	3
Septiembre	10	2	4	0	2
Octubre	11	3	3	0	3
Noviembre	nt	Nt	nt	nt	4
Diciembre	nt	Nt	65	nt	8

### 3.3.4 Transmisión del fitoplasma de PD mediante injerto de yemas infectadas a perales sanos durante el invierno

Los análisis por PCR indican que de 21 árboles injertados con yemas infectadas, 12 (57%) dieron amplificación positiva para el ADN del fitoplasma en el análisis realizado en Julio de 2002 (8 de 9 árboles injertados en Febrero de 2001, y 4 de 12 árboles injertados en Febrero de 2002, Tabla 6). Ninguno de los árboles injertados con yemas de perales sanos amplificó para el fitoplasma de PD.

**Tabla 3.6-** Detección del fitoplasma de PD en nervios de hoja mediante nested-PCR, después de injertar yemas infectadas y no infectadas, en *Pyrus communis* OHF-333 sanos. La fracción indica el número de árboles injertados, infectados con el fitoplasma de PD, en relación con el número total de árboles injertados.

Fechas de análisis por PCR	Mes en el que se injertaron las yemas			
	Feb-2001		Feb-2002	
	Injerto con yemas infectadas	Injerto con yemas sanas	Injerto con yemas infectadas	Injerto con yemas sanas
Mayo-01	1/9	0/6	/	/
Nov-01	2/9	0/6	/	/
Mayo-02	8/9	0/6	2/12	0/6
Jul-02	8/9	0/6	4/12	0/6

### 3.4 Discusión

La detección del ADN del fitoplasma de PD mediante la técnica de PCR en tres variedades distintas de peral, siguió el mismo patrón durante los dos años de estudio, sin embargo varió según la variedad estudiada (Figura 3.1). Blanquilla fue la variedad que presentó menores porcentajes de detección en todos los muestreos. Un estudio reciente indica la posibilidad que esta variedad sea más tolerante a la enfermedad de PD, y que por tanto, también muestre menor incidencia de árboles con síntomas en comparación con Bartlett y Limonera (Batlle *et al.*, 2001). En un estudio realizado por Seemüller y sus colaboradores, se indica que la remisión de síntomas en peral no supone la desaparición del fitoplasma (Seemüller *et al.*, 1998). Sin embargo, trabajos realizados en vid y en árboles

frutales de hueso, indican que la recuperación de las plantas conlleva también la desaparición del fitoplasma en las hojas o a la disminución de la concentración de los mismos (Kison & Seemüller, 2001; Osler *et al.*, 2003). En Blanquilla, aunque sí hubo detección durante todo el año, ésta fue menor, lo que podría señalar un menor número de fitoplasmas en el floema del árbol, como consecuencia de una posible recuperación.

Los resultados obtenidos también muestran que la mejor época para detectar el fitoplasma de PD en clima mediterráneo fue el mes de Diciembre (Figura 3.1). Si nuestro estudio los comparamos con trabajos anteriores realizados en la variedad Bartlett, en Alemania y utilizando la técnica DAPI como método de detección (Seemüller *et al.*, 1984) se observan algunas diferencias. En Alemania el mes más apropiado para hacer una buena detección fue Septiembre, con valores de 100%. La detección en los meses siguientes disminuyó suavemente hasta Diciembre, y a partir de Enero hubo un fuerte descenso, detectándose además, mayoritariamente, formas características de fitoplasmas degradados y llegando a una detección nula en el mes de Abril (Seemüller *et al.*, 1984). En el clima mediterráneo, en cambio, la elevada detección obtenida en Diciembre se mantuvo más o menos constante hasta el mes de Marzo o Abril según la variedad, meses en los que la amplificación del ADN fitoplasmático volvió a disminuir fuertemente, coincidiendo con el crecimiento de los nuevos brotes de primavera.

Las diferencias obtenidas en la detección entre ambos trabajos podrían ser atribuibles tanto a la técnica utilizada para la detección, diferente en cada estudio, como a la climatología de ambos países. Alemania, con clima centroeuropeo, tiene unos inviernos más fríos que España, con clima mediterráneo. Esto podría provocar, que en climas más suaves, donde las temperaturas no alcanzan mínimas tan bajas, el floema de la parte aérea del árbol pueda mantenerse en estado funcional durante más tiempo, y la población de fitoplasmas pueda continuar distribuyéndose, sin que esto implique necesariamente un aumento en la concentración de fitoplasmas.

Existen diferentes estudios, que muestran como por lo general, en plantas leñosas, los fitoplasmas hibernan en las raíces de sus huéspedes hasta la primavera, en la que vuelven a subir hacia la parte aérea del árbol (Rosenberg & Jones, 1977; Seidl, 1965; Braun & Sinclair, 1976). En perales y manzanos, estudios realizados mediante el microscopio de fluorescencia (DAPI) en países centroeuropeos, muestran que los fitoplasmas de AP y PD se encuentran presentes en las raíces durante el invierno, y desaparecen o están en muy bajas concentraciones en las partes aéreas (Schaper, 1981). Además, durante el mes de

Febrero las transmisiones del fitoplasma a planta sana fueron negativas en casi todos los casos y nulas en Marzo (Schneider, 1970, Schneider 1971; Seemüller *et al.*, 1984). Sin embargo, nuestro estudio muestra que el fitoplasma de PD se puede transmitir en Febrero, indicando la presencia de fitoplasmas infectivos en las ramas durante el invierno (Tabla 3.6). Por tanto, es posible que en climas más suaves como el mediterráneo, en el periodo de Enero a Abril-Mayo (dependiendo de la variedad), parte de los fitoplasmas activos descendan hacia el floema de las raíces (Rosenberg & Jones, 1977), y que la elevada detección por PCR en muestras de la parte aérea del árbol, sea debida a restos de los fitoplasmas degradados, pero una pequeña proporción podría hibernar en la parte aérea del árbol, utilizando el floema de reemplazamiento desarrollado en el árbol hacia finales de Otoño, como medida de resistencia a la enfermedad de PD (Schaper & Seemüller, 1982). Se han obtenido resultados similares en otro trabajo que confirman este hecho. En ciruelo se transmitió el fitoplasma ESFY por injerto durante el invierno (Seemüller *et al.*, 1998) y hubo amplificación por PCR en árboles infectados en esta época (Jarausch *et al.*, 1999).

Por otra parte, la disminución brusca en la detección por PCR de fitoplasmas en Abril-Mayo, según el momento en el que despierte el árbol de la fase de hibernación (Figura 3.1), podría ser debida a la formación del nuevo floema que se inicia a partir de la primera mitad de Marzo (Evert, 1960) y que todavía no ha sido colonizado por los fitoplasmas de las raíces, así como a una dilución de los restos fitoplasmáticos en la nueva savia formada, lo cual provocaría una disminución en la detección por PCR del fitoplasma del PD.

Los resultados obtenidos sugieren que en climas mediterráneos, el fitoplasma de PD se encuentra presente en la parte aérea del árbol durante más tiempo que en clima centroeuropeo. Este resultado debería tenerse en cuenta, ya que la técnica de recolección de yemas o estaquillas durante el invierno, para la posterior propagación vegetativa, podría estar diseminando aún más la enfermedad de PD, muy extendida ya de por sí en países con clima mediterráneo.

Con respecto a cual es la parte estructural idónea para la detección del fitoplasma de PD, el tallo fue donde se obtuvieron mayores detecciones para 2 de las 3 variedades (Figuras 3.2 y 3.3). En la variedad Blanquilla aunque no destacó ninguna parte como preferente durante todo el año, en determinados meses también fue el tallo la que presentó mayores porcentajes de detección. Destacar además, que durante los meses de Abril y Mayo, época en la que la detección disminuye, en las tres variedades hubo amplificación por PCR casi exclusivamente en tallo de ramas de 2º año (datos no mostrados). Que el tallo

sea considerado como la parte del árbol apropiada para una detección más fiable resulta beneficioso, ya que su recolección para una certificación de material vegetal libre de fitoplasmas se puede realizar en cualquier estación aún y sabiendo que la época más apropiada es Diciembre.

El análisis de correlación mostró que a lo largo del año, en las variedades Bartlett y Limonera, cuando el número de árboles con síntomas aumentaba, la proporción de árboles con síntomas detectados por PCR también aumentaba. De esta forma, se demuestra que la sintomatología está asociada a la presencia del fitoplasma en ambas variedades. Estos resultados coinciden con un estudio anterior realizado para otras variedades durante los meses de otoño (Giunchedi *et al.*, 1995). Sin embargo, en Blanquilla no hubo correlación. La posible tolerancia de Blanquilla hacia la enfermedad, probablemente llevó a una disminución en la concentración de fitoplasmas (Kison & Seemüller, 2001) que se refleja en la menor detección por PCR. El hecho que no haya habido correlación entre árboles con síntomas y detección en esta variedad, probablemente es debido a que la expresión de síntomas estuvo sobrevalorada, al contabilizarse la suave disminución de la masa vegetativa en los árboles como expresión de síntomas y esto quedó reflejado en la correlación.

Finalmente, en ninguna de las tres variedades se obtuvo una correlación entre el número de árboles con síntomas, y el número total de árboles positivos por PCR (con o sin síntomas). Por lo tanto, fue posible detectar el fitoplasma de PD por PCR, sin que los árboles presentaran síntomas. Así, la amplificación del ADN fitoplasmático por PCR se presenta como un método más fiable para diagnosticar la enfermedad de PD que la observación por síntomas, y Diciembre como el mes idóneo para realizar el análisis.

### **3.5 Bibliografía**

- Ahrens, U., Seemüller, E., 1992. Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology* 82, 828- 832.
- Battle, A., Laviña, A., Garcia, M., Sanchez, I., Sabater, J., Medina, V., 2001. Incidence, detection and epidemiology of pear decline in Northeastern Spain. *Proceedings of the 5th Congress of the European Foundation for Plant Pathology (CD version)*. Taormina, Italy.
- Battle, A., Martinez, M.A., Laviña, A., 2000. Occurrence, distribution and epidemiology of grapevine yellows in Spain. *European J. Plant Pathol.* 106, 811-816.

- Blodget, E.C., Aichele, M.D., Parsons, J.L., 1963. Evidence of a transmissible factor in pear decline. *Plant Dis. Repr.* 47, 89-93.
- Braun, E., Sinclair, W., 1976. Hystopathology of phloem necrosis in *Ulmus americana*. *Phytopathology* 66, 598-607.
- Daire, X., Boudon-Padieu, E., Berville, A., Schneider, B., Caudwell, A., 1992. Cloned DNA probes for detection of grapevine Flavescence doree mycoplasma-like organism (MLO). *Ann. Appl. Biol.* 121, 95-103.
- Deng, S., Hiruki, C., 1991. Amplification of 16s rRNA genes from culturable and nonculturable mollicutes. *J. Microbiol. Meth.* 14, 53-61.
- Evert, R.F., 1960. Phloem structure in *Pyrus communis* L. and its seasonal changes. University of California Publications in Botany 32, 127-194.
- Evert, R.F., 1963. The cambium and seasonal development of the phloem in *Pyrus malus*. *Am. J. Bot.* 50, 149-159.
- Green, M.J., Thompson, D.A., MacKenzie, D.J., 1999. Easy and efficient DNA extraction from woody plant for the detection of phytoplasmas by Polymerase Chain Reaction. *Plant Dis.* 83, 482-485.
- Griggs, W.H., 1965. Topgrafting potted trees. Prog Rep on Pear Decline, University of California, Div Agric Sci, Berkeley 1965, 10-11.
- Giunchedi, L., Poggi Pollini, C., Bissani, R., Babini, A.R., Vicchi, V., 1995. Etiology of a pear decline disease in Italy and susceptibility of pear variety and rootstock to phytoplasma-associated pear decline. *Acta Hort.* 489-95
- Hildebrand, E.M., 1953. Yellow-red or X-disease of peach. Cornell Univ. Agric. Exp. Stn. Mem. 323, 54pp.
- Jarausch, W., Saillard, C., Dosba, F., Bové, J. M., 1994. Differentiation of mycoplasma-like organisms (MLOs) in European fruit trees by PCR using specific primers derived from sequence of a chromosomal fragment of the apple proliferation MLO. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 2916-2923
- Jarausch, W., Lansac, M., Dosba, F., 1999. Seasonal colonization pattern of European stone fruit yellows phytoplasmas in different *Prunus* species detected by specific PCR. *J. Phytopathol.* 147, 47-54.
- Kison, H., Seemüller, E., 2001. Differences in strain virulence of the European stone fruit yellows phytoplasma and susceptibility of stone fruit trees on various rootstocks to this pathogen. *J. Phytopathol.* 149, 533-541.

- Lorenz, K.-H., Schneider, B., Ahrens, U., Seemüller, E., 1995. Detection of the apple proliferation and pear decline phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and nonribosomal DNA. *Phytopathology* 85, 771-776.
- Maliyakal E. J., 1992. An efficient method for isolation of RNA and DNA from plants containing polyphenolics. *Nucleic Acids Res.* 20 (9), 2381.
- Marzachì, C., Alma, A., D'Aquilio, M., Minuto, G., Boccardo, G., 1999. Detection and identification of phytoplasmas infecting cultivated and wild plants in Liguria (Italian Riviera). *J. Plant Pathol.* 81 (2), 127-136.
- MengLing. W., TunTschu Ch., LaingChour W., ChuenHsu, F., 2002. Rapid detection of phytoplasma associated with paulownia witches'-broom using a nonradioactive DNA probe and a PCR-based assay. *Taiwan J. Forest Sci.* 172, 123-133.
- Osler, R., Carraro, L., Ermacora, P., Ferrini, F., Loi, F., Loschi, A., Martini, M., mutton, P.B., Refatti, E., 2003. Roguing: A controversial practice to eradicate Grape yellows caused by phytoplasmas. 14<sup>th</sup> Meeting of the international Council for the Study of Virus and Virus-like diseases of the Grapevine (ICGV). September 12-17, Locorotondo, Italy.
- Rosenberg, D.A., Jones, A.L., 1977. Seasonal variation in infectivity of inoculum from X-diseased peach and choke-cherry plants. *Plant Dis. Repr.* 61, 1022-1024.
- Schaper, U., 1981. Untersuchungen zum Nachweis und Besiedlungsverhalten sowie zur Bekämpfung der Erreger der Triebsucht des Apfels und des Birnenverfalls. University of Göttingen. Dissertation.
- Schaper, U., Seemüller, E., 1982. Condition of the phloem and the persistence of mycoplasma-like organisms associated with apple proliferation and pear decline. *Phytopathology* 72, 736-742.
- Schneider, B., Seemüller, E., Smart, C. D., Kirkpatrick, B. C., 1995. Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas. In: *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmaology*, Vol. 2. Ed. by Razin, S.; Tully, J. G. New York: Academic Press, pp. 369-380.
- Schneider H, 1970. Graft transmission and host range of pear decline causal agent. *Phytopathology* 60, 204-207.
- Schneider, H., 1971. Infectivity of stem scions versus root scions from pear decline-infected *Pyrus* sp. 'Variolosa' trees following dormancy chilling. *Phytopathology* 61, 1324.
- Seemüller, E., Schaper, U., Zimmermann, E., 1984. Seasonal variation in the colonization patterns of mycoplasma-like organisms associated with apple proliferation and pear decline. *J. Plant Dis. Protect.* 91, 371-382.
- Seemüller, E., Stolz, H., Kison, H., 1998. Persistence of the European stone fruit yellows phytoplasma in aerial parts of *Prunus* taxa during dormant season. *J. Phytopathol.* 146, 407-410.

- Seidl, V., 1965. The possibility of using root grafting method of testing for apple proliferation virus disease. *Zâstita Bilja* 16, 323-327.
- Seidl, V., Komarkova, V., 1973. On some problems of apple proliferation disease. Proceedings of the 7<sup>th</sup> Conference of Czechoslovak Plant Virologists, 1971. Slovak Academic Science. Bratislava.
- Shalla, T. A., Carroll, T. W., Chiarappa, L., 1964. Transmission of pear decline by grafting. *Calif. Agric.* 18, 4-5.
- Smart, C.D., Schneider, B., Blomquist, C.L., Guerra, L.J., Harrison, N.A., Ahrens, U., Lorenz, K.-H., Seemüller, E., Kirkpatrick, B.C, 1996. Phytoplasma-Specific PCR Primers Based on sequences of the 16S-23S rRNA Spacer Region. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 2988-2993.
- Stoddard, L.M., 1947. The X-disease and its chemotherapy. *Conn. Agric. Exp. Stn. Bull.* 506, 1-19.
- Waterworth, H.E., Mock, R., 1999. An assessment of nested PCR to detect phytoplasmas in imported dormant buds and internodal tissues of quarantined tree fruit germplasm. *Plant Dis.* 83, 1047-1050.

# 4

## **Estudio de la transmisión del fitoplasma del Decaimiento del peral en España por *Cacopsylla pyri*. Influencia del sexo del insecto en la adquisición y transmisión del fitoplasma.**

### **Resumen**

Se ha estudiado la eficiencia de *Cacopsylla pyri* (Homoptera; psyllidae) en la adquisición y transmisión del fitoplasma del Decaimiento del peral (PD) en el Nordeste de España. Durante un año, se capturaron mensualmente alrededor de unas 100 psilas, para analizar si estaban infectadas con el fitoplasma de PD. También se realizaron ensayos de transmisión del fitoplasma a perales sanos y medios nutritivos azucarados, utilizando *C. pyri* como vector. Los resultados obtenidos demostraron que *C. pyri* transmite el fitoplasma a peral y medios artificiales, y por tanto es, como en otros países del área mediterránea, vector de la enfermedad en España. El porcentaje de individuos de *C. pyri* portadores del fitoplasma varió a lo largo del año, siguiendo un patrón estacional.

Se ha evaluado la relación existente entre el sexo del vector y la transmisión del fitoplasma de PD. Los porcentajes de psilas infectadas fueron similares entre sexos, sin embargo las hembras transmitieron el fitoplasma en mayor porcentaje que los machos. Teniendo en cuenta que la proporción de hembras respecto a machos en la población es superior durante gran parte del año, deberían considerarse los resultados obtenidos para un futuro tratamiento y control de la enfermedad.

Palabras clave: *Cacopsylla pyri*, adquisición, transmisión, PCR, medio artificial

Enviado a la revista: *European Journal of Plant Pathology*.

## 4.1 Introducción

Los fitoplasmas, se transmiten de una planta a otra mediante injerto, o por insectos vectores del orden Homoptera. Los vectores de fitoplasmas del grupo AP identificados hasta ahora, pertenecen mayoritariamente a la familia psyllidae (Sbo. Sternorrhyncha).

El fitoplasma del Decaimiento del peral (PD) incluido en el grupo AP y, cuyos vectores son distintas especies del genero *Cacopsylla*, causa importantes pérdidas de producción, allí donde se cultiva el peral. Las psilas *C. pyricola* y *C. pyrisuga* han sido identificadas como transmisoras del fitoplasma en Norte América y Reino Unido (Jensen *et al.*, 1964; Hibino *et al.*, 1971, Davies *et al.*, 1992). También se ha demostrado que *C. pyri* transmite la enfermedad en Italia (Carraro *et al.*, 1998) y Francia (Lemoine, 1984; Lemoine, 1991), y ha sido identificada como portadora de la enfermedad en España (Avinent *et al.*, 1997; Batlle *et al.*, 1999), aunque hasta el momento, su capacidad de transmisión no había sido evaluada.

Debido a que la psila adquiere el fitoplasma de forma persistente (Lee *et al.*, 2000), y al hecho de que es considerada como la plaga más importante del peral en Europa (Kapatos & Stratopoulou, 1999), se han invertido grandes esfuerzos en su control. Sin embargo, *C. pyri* es capaz de desarrollar resistencias a los insecticidas (Berrada *et al.*, 1994; Buès *et al.*, 1999; Follet *et al.*, 1985), por lo que es difícil erradicarla completamente. Actualmente, se están utilizando programas de control integrado (Souliotis & Broumas, 1990; Souliotis & Broumas, 1998; Sarasua *et al.*, 1999) para disminuir los daños causados por este insecto.

Para ejercer un control eficaz de la psila, es necesario conocer algunos factores, como la facilidad que tiene de adquirir el fitoplasma, así como su habilidad para transmitirlo a lo largo del año. Se han realizado algunos estudios con *C. pyricola* (Davies *et al.*, 1998; Blomquist & Kirkpatrick, 2002) y *C. pyri* (Carraro *et al.*, 2001), pero la adquisición y transmisión dependen del comportamiento que adopte el insecto en una determinada área geográfica, o ante un factor ecológico concreto (Fletcher *et al.*, 1998). Por tanto, en las diferentes áreas donde la enfermedad está presente, el comportamiento de la psila podría ser distinto y, por lo tanto, necesario de estudiar, para establecer unas medidas de control eficientes.

Por último, se ha descrito que un medio rico en azúcares es adecuado para estudiar la transmisión del fitoplasma de la FD por el vector *Euscelidius variegates*, (Tanne *et al.*, 2001).

Teniendo en cuenta los conocimientos anteriores, el objetivo de este trabajo ha sido evaluar si *C. pyri* es también transmisora del fitoplasma de PD en España, y analizar la eficiencia de transmisión a lo largo del año. Para ello, se han utilizado perales sanos y un medio nutritivo rico en azúcares. También se ha evaluado mensualmente, el porcentaje de psilas infectadas en una parcela con un alto índice de infección de PD. Finalmente, se ha estudiado la relación entre el sexo del vector y la transmisión de la enfermedad.

## **4.2 Material y métodos**

### **4.2.1 Localización y características de la parcela utilizada en este estudio**

Este estudio se realizó en una parcela con perales de la variedad Williams, situada en la provincia de Lérida. Esta parcela, con árboles no certificados de entre 12 y 14 años de edad e injertados sobre membrillero, fue escogida por haberse detectado en años anteriores el fitoplasma de PD y presentar síntomas evidentes de la enfermedad. A pesar de la aplicación de tratamientos insecticidas, también se había observado la presencia abundante de psilas.

En Septiembre de 2001, se evaluó en esta parcela la incidencia de la enfermedad. Para ello, se escogieron 20 árboles de forma aleatoria y se realizó una extracción de ADN según la metodología descrita por Ahrens & Seemüller (1992). La presencia del fitoplasma se determinó por PCR con los cebadores universales P1/P7 (Deng & Hiruki, 1991; Schneider *et al.*, 1995) y los específicos fO1/rO1 (Lorenz *et al.*, 1995), según la metodología explicada en el apartado 2.2.2.1.

### **4.2.2 Transmisión del fitoplasma de PD por *C. pyri* a perales sanos**

En Septiembre de 2001, se capturaron 10 grupos de 30 psilas en la parcela indicada en el apartado anterior, que fueron transferidos individualmente a 10 *Pyrus communis* OHF-333 sanos, de 2 años de edad, obtenidos por cultivo *in vitro*. Cada peral se mantuvo en una caja individual. Paralelamente, se escogieron otros 10 perales sanos como control negativo. Tras 30 días, se recogieron las psilas para analizar si éstas portaban el fitoplasma. Una vez finalizado el ensayo, los perales fueron tratados periódicamente con insecticidas hasta la desaparición de huevos y psilas de las generaciones descendientes, y se mantuvieron en un invernadero protegido con malla para evitar la entrada-salida de insectos. La presencia del

fitoplasma en los árboles se analizó en Septiembre de 2002, tal y como se describe en el apartado 2.2.2.1.

#### **4.2.3 Adquisición del fitoplasma de PD por *C. pyri* y transmisión a un medio nutritivo**

De Junio de 2002 a Mayo de 2003, exceptuando Enero y Marzo ya que la población de psilas era muy baja, se capturaron mensualmente unos 100 adultos de *C. pyri*, mediante la técnica de batido (Burts & Retain, 1973). Cada muestreo se realizó entre las 10 y las 12 de la mañana. Estas psilas se transfirieron a tubos, donde fueron mantenidos durante 1 día para evitar, debido a posibles restos de fitoplasmas en el estilete, falsos positivos en la detección.

Al día siguiente, cada una de las psilas se transfirió a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml de capacidad. Cada tapón de tubo se rellenó con 200 µl de una solución compuesta de sacarosa al 5%, sorbitol al 0,5% y 9,4 mg/l de medio NCTC 135 (Sigma) (Maixner, comunicación personal) y se selló con Parafilm (American National Can Co.). Los tubos con las psilas se mantuvieron entre 23 y 25°C de temperatura, hasta que el insecto murió o durante un máximo de 72 h. Se anotaron los días de la muerte de cada insecto.

Una vez en el laboratorio, los adultos se dividieron según su sexo, agrupándolos de 4 en 4 y se calculó la sex ratio (machos /hembras).

#### **4.2.4 Detección del fitoplasma de PD en insectos y medio nutritivo**

##### 4.2.4.1 Extracción de ADN

Se realizó la extracción de ADN de los insectos y del medio artificial para determinar la presencia del fitoplasma por nested-PCR.

*Extracción de ADN de insectos:* Se realizó según la metodología indicada por Daire *et al.*, (1992) ligeramente modificada. Se homogeneizaron los insectos de 4 en 4 en tampón de extracción (100 mM Tris-HCl, pH 8, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, 2% CTAB y 0,2 % 2-mercaptoetanol), y se incubaron durante 10 min a 65°C. Tras la incubación, se añadió cloroformo (V/V) y la mezcla se centrifugó 10 min a 12000 rpm. El sobrenadante se recogió y transfirió a un nuevo tubo de microcentrífuga añadiendo 2/3 del volumen de 2-propanol e incubando la mezcla 30 min a -20°C. El ADN se precipitó a 12000 rpm durante

30 min. El precipitado final se lavó con etanol 70% y se resuspendió con 50 µl de H<sub>2</sub>O destilada estéril.

*Extracción de ADN del medio nutritivo:* La extracción se realizó siguiendo la metodología de Wizard plus (Wizard plus, SV minipreps. DNA purification system, Promega) ligeramente modificada. Los 200 µl de medio se transfirieron a un nuevo tubo de microcentrífuga de 1,9 ml y se añadieron 900 µl de tampón TNE (SDS 1,1 %, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl a pH 8), 100 µl de Guanidina- HCl 5 M y 50 µl de proteinasa K (20 mg/ml). La mezcla se incubó durante 2 h a 58°C y seguidamente se centrifugó 10 min a 13000 rpm. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo añadiendo cloroformo (V/V) y centrifugando durante 10 min a 13000 rpm. En un nuevo tubo de microcentrífuga, se mezclaron por inversión 500 µl del sobrenadante y 1 ml de resina purificadora de ADN (Wizard minipreps, Promega). La mezcla se transfirió a una Wizard-columna y se aplicó el vacío. Una vez que todo el líquido pasó por la columna, se añadió 1 ml de 2-propanol y se volvió a aplicar el vacío. Finalmente, la columna se transfirió a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml y el ADN se diluyó añadiendo 50 µl de H<sub>2</sub>O destilada libre de nucleasa y centrifugando a 13000 rpm durante 1 min.

#### 4.2.4.2 Amplificación por PCR

Los extractos de ADN fueron analizados para determinar la presencia del fitoplasma de PD mediante nested-PCR. La primera amplificación se realizó con los cebadores universales P1/P7 y la segunda, con los específicos fO1/rO1 según la metodología explicada en el apartado 2.2.2.1.

#### **4.2.5 Análisis estadístico**

Los resultados de la adquisición del fitoplasma de PD en machos y hembras de *C. Pyri*, fueron analizados con el paquete estadístico Systat 5.0 (Systat for Windows, Inc. Evanston, Illinois, USA). Para determinar si la infección dependía del sexo o del momento de captura de la psila, se compararon las proporciones de infección, obtenidas mediante tablas de contingencia Kx2x2, con el estadístico de X<sup>2</sup> de Mantel-Haenszel.

Las frecuencias de infección obtenidas de los grupos muestreados según el género de la psila o del momento de muestreo, fueron evaluadas por tablas de contingencia 2x2 y kx2

respectivamente, con un análisis  $X^2$ . Se utilizó el test ajustado de Bonferroni para comparar las proporciones de adquisición entre meses ( $gdl = 1$ ).

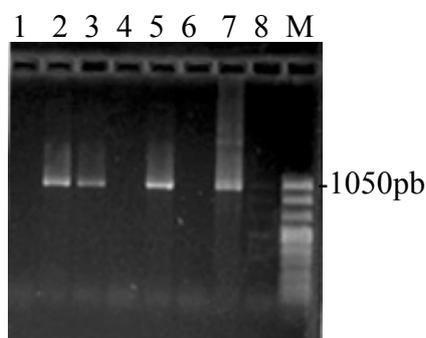
Para estimar el número de insectos (machos o hembras) infectados con el fitoplasma de PD en cada uno de los meses analizados, se utilizó el valor P (Hughes *et al.*, 2001),  $P = 1 - (1 - X)^{1/n}$  (siendo P la proporción de insectos positivos, X la proporción de grupos de insectos positivos y n el número de insectos por grupo). Con esta fórmula se asume la distribución binomial. La relación entre el porcentaje total de psilas infectadas y la infección según el sexo de la psila, se estudió mediante correlación lineal. Las pendientes de las líneas de regresión obtenidas, fueron comparadas utilizando el programa Statgraphics Plus program (Manugistics, Inc., Maryland, USA.).

El estadístico  $X^2$  también se utilizó para determinar la relación existente entre el número de psilas infectadas y la transmisión del fitoplasma a medio artificial, según el sexo. En este caso, se volvió a calcular el número estimado de psilas infectadas mediante el valor P, teniendo en cuenta que fueron excluidas las psilas que murieron el primer día de incubación en medio artificial.

### 4.3 Resultados

#### 4.3.1 Incidencia del fitoplasma de PD en la parcela estudiada

Los resultados de la nested-PCR mostraron que un 80% de los árboles escogidos al azar de la parcela Williams, en la que se ha realizado este estudio, estaban infectados por el fitoplasma de PD (Figura 4.1).



**Figura 4.1-** Amplificación por nested-PCR de algunos extractos de ADN de perales de la parcela Williams (Carriles 1-6). M: Marcador molecular, pUC Mix Marker, 8.

### 4.3.2 Transmisión del fitoplasma de PD por *C. pyri* a perales sanos

En la Tabla 4.1 se presenta el resultado del análisis por nested-PCR, de las psilas que fueron mantenidas durante un mes en perales sanos, así como el porcentaje de árboles que adquirieron el fitoplasma. Todos los grupos de psilas fueron positivos para PD y todos los árboles que estuvieron expuestos durante un mes a la presencia de psilas, resultaron positivos en la amplificación para el fitoplasma de PD. No se detectó la presencia del fitoplasma en los perales sanos escogidos como control negativo.

**Tabla 4.1-** Detección del fitoplasma de PD mediante nested-PCR, en los 10 grupos de psilas capturadas de la parcela Williams y en los perales utilizados en el ensayo de transmisión.

Análisis PCR		
Octubre 2001	Septiembre 2002	
Grupos de psilas infectadas/ Total grupos psilas	Plantas infectadas/plantas expuestas a psila	Plantas infectadas/plantas control sanas
10/10	10/10	0/10

### 4.3.3 Adquisición del fitoplasma de PD por *C. pyri* en una parcela de peral variedad Williams

En la tabla 4.2 se presentan los resultados del porcentaje de grupos de psilas y del número estimado de psilas infectadas con el fitoplasma de PD, a lo largo del año. Los resultados obtenidos, muestran que las psilas adquirieron el fitoplasma durante todo el año, aunque los porcentajes variaron según la estación. Los mayores porcentajes estimados de psilas infectadas se obtuvieron en Septiembre y Octubre (100% y 41,14% respectivamente), y los menores en Febrero (6,6%). En los meses restantes, los valores oscilaron entre un 15 y un 25 %. El análisis de Mantel-Haenszel muestra que no existe interacción entre las tres variables “tiempo”, “infección” y “sexo” ( $P = 0,551$ ). De esta manera, se aplicó un análisis de contingencia  $K \times 2$ , demostrándose una asociación significativa entre el momento de muestreo (mes) y el porcentaje de psilas infectadas ( $X^2 = 42,21$ ;  $gdl = 9$ ;  $P < 0,001$ ).

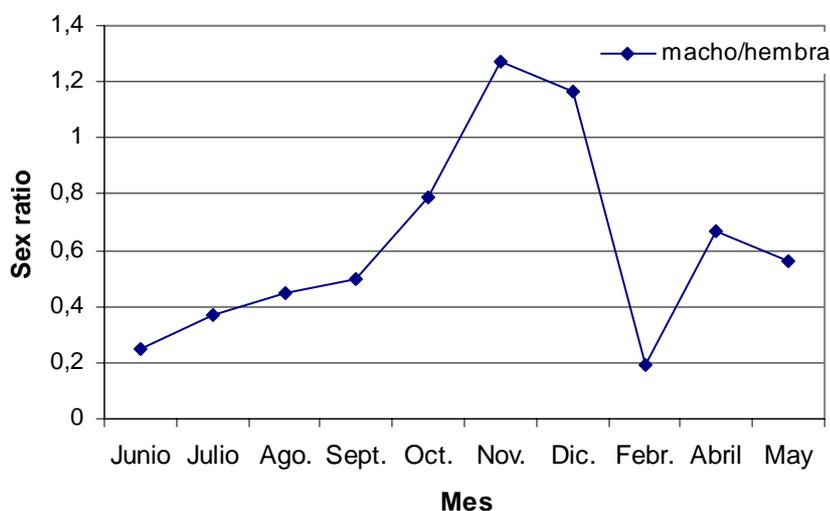
El test de ajuste de Bonferroni muestra que el porcentaje de grupos de psilas infectas en Septiembre fue significativamente mayor que en Noviembre, Diciembre, Febrero, Abril, Mayo y Junio ( $X^2 = 15,65$ ;  $P < 0,0001$ ;  $X^2 = 28,93$ ;  $P < 0,0001$ ;  $X^2 = 14,72$ ;  $P = 0,0001$ ;  $X^2 = 13,12$ ;  $P = 0,0003$ ;  $X^2 = 12,41$ ;  $P = 0,0004$ ). También se obtuvieron diferencias entre Febrero y Octubre ( $X^2 = 20,43$ ;  $P < 0,0001$ ).

**Tabla 4.2-** Detección mensual del fitoplasma de PD en aproximadamente 100 psilas, capturadas en una parcela Williams afectada por la enfermedad. De Junio de 2002 a Mayo de 2003, las psilas se agruparon de 4 en 4, separando ambos sexos, y se analizaron mediante nested-PCR con los cebadores universales P1/P7 y los específicos fO1/rO1. \* El valor P (Hughes *et al.*, 2001) se utilizó para hacer una estima del número de insectos (machos o hembras) infectados con el fitoplasma durante el año.

Mes	Nº de grupos de ♀ infectadas con el fitoplasma de PD / grupos totales de ♀.	% de grupos de ♀ infectadas con el fitopl. De PD	Nº ♀ infectadas con el fitopl. de PD según el valor P*.	% de ♀ infectadas según el valor P*.	Nº de grupos de ♂ infectados con el fitopl. de PD/ grupos totales de ♂.	% de grupos de ♂ infectados con el fitopl. de PD.	Nº ♂ infectados con el fitopl. De PD según el valor P*.	% de ♂ infectados según el valor P*.	Número total de grupos	% de grupos infectados con el fitopl. de PD	% de psilas infectadas (total) según el valor P*.
Junio	11/20	55	14,5	18	4/5	80	6,6	33	25	60	20,47
Julio	14/19	73,68	21,6	28,42	4/7	57,14	5,3	18,92	26	69,23	25,52
Agosto	9/18	50	11,5	15,97	6/8	75	9,4	29,37	26	57,69	19,35
Septiembre	16/16	100	64	100	8/8	100	32	100	24	100	100
Octubre	13/14	92,86	27	48,21	9/11	81,82	15,3	34,77	26	84,62	41,14
Noviembre	5/11	45,45	6,2	14,09	8/14	57,14	10,7	19,10	26	50	16,76
Dic-Ene	6/12	50	7,6	15,83	7/14	50	8,9	15,89	26	50	15,91
Febrero	5/21	23,81	5,5	6,54	1/4	25	1,1	6,87	25	24	6,63
Abril	7/15	46,67	8,7	14,5	6/10	60	8,2	20,5	25	52	16,76
Mayo	9/16	56,25	11,9	18,59	5/9	55,56	6,6	18,33	25	56	18,56

#### 4.3.4 Sex ratio de la población adulta de *C. pyri*

En la figura 4.2 se presentan los resultados obtenidos de la sex ratio (macho / hembra) de la población adulta de *C. pyri*, a lo largo de un año. En la mayoría de los meses, la proporción de psilas macho fue menor del 50%, con excepción del periodo invernal en el que la sex ratio alcanzó valores cercanos a 1:1. Durante los meses de Abril y Octubre, hubieron dos picos de emergencia de población adulta, y la proporción de machos se acercó al 50% (ratios de 0,66:1 y 0,75:1 respectivamente).

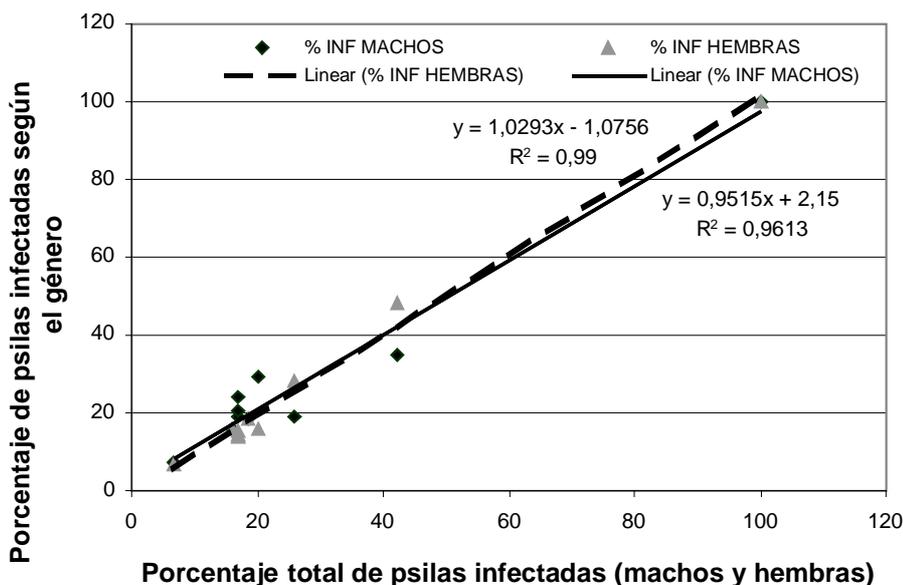


**Figura 4.2-** Resultado de la evolución de la sex ratio (machos/ hembras) desde Junio de 2002 a Mayo de 2003 en una población adulta de *C. pyri*.

#### 4.3.5 Adquisición del fitoplasma según el sexo de *C. pyri*

En la tabla 4.2 se presenta la proporción de grupos (machos o hembras) y el porcentaje estimado de psilas (machos o hembras) PCR- positivos para el fitoplasma de PD, a lo largo del año. Durante la mayoría de meses, las proporciones estimadas de psilas infectadas en machos y hembras fueron muy similares, con excepción de los meses de Junio, Julio, Agosto y Octubre, en los que se obtuvieron diferencias de un 10 a un 15% entre ambos sexos. En Septiembre y Octubre se obtuvieron los máximos porcentajes estimadas de psilas infectadas (100% en Septiembre para ambos sexos; 48% en hembras, 34% en machos en

Octubre). El análisis de  $X^2$  muestra que no existe asociación entre el sexo de la psila y el número de grupos portadores del fitoplasma de PD ( $P= 0,42$ ). El análisis de regresión para ambos géneros, realizado a partir del valor estimado del número de psilas infectadas por el fitoplasma (Figura 4.3) confirma los resultados anteriores, mostrando que no existen diferencias entre las pendientes de ambas rectas ( $R^2 = 0,97$ ;  $P < 0,0001$  en hembras y  $R^2 = 0,91$ ;  $P < 0,0001$  en machos) ( $P= 0,32$ ).



**Figura 4.3-** Análisis de la relación existente entre el porcentaje de individuos de *C. pyri* infectados con el fitoplasma de PD según el sexo y el porcentaje total de psilas infectadas.

#### 4.3.6 Transmisión del fitoplasma de PD a un medio nutritivo rico en azúcares según el género de *C. pyri*.

Los resultados de la transmisión del fitoplasma de PD a medio nutritivo están resumidos en la Tabla 4.3. Las psilas transmitieron el fitoplasma de PD durante todo el año, con la única excepción del mes de Febrero. Durante el periodo de Mayo a Octubre (exceptuando el mes de Septiembre) los porcentajes totales de transmisión fueron relativamente elevados, alcanzando el máximo en Agosto (69,57 %). El resto del año, los valores descendieron (0-18,3%). Durante 8 meses, la capacidad de transmisión del fitoplasma varió en función del sexo, siendo superior en las hembras. El análisis estadístico

confirmó la existencia de diferencias significativas en la transmisión entre sexos ( $X^2 = 5,14$ ;  $df = 1$ ;  $P = 0,02$ ).

**Tabla 4.3-** Detección mensual del fitoplasma de PD en un medio nutritivo rico en azúcares. La presencia del fitoplasma de PD se analizó mediante nested-PCR. \*El valor P (Hughes *et al.*, 2001) se utilizó para hacer una estima del número de insectos (machos o hembras) infectados con el fitoplasma durante el año. La estimación se hizo descartando las psilas que murieron el primer día.

Mes	Nº de medios nutritivos infectados por ♀ con el fitoplasma de PD	Nº de ♀ infectadas con el fitoplasma de PD según el valor P*	% de medios nutritivos infectados por ♀ según el valor P*.	Nº de medios nutritivos infectados por ♂ con el fitoplasma de PD	Nº de ♂ infectados con el fitoplasma de PD según el valor P*.	% de medios nutritivos infectados por ♂ según el valor P*.	% de medios nutritivos (total) infectados con el fitopl. de PD. según el valor P*.
Junio	4	13,60	29,41	3	5,3	56,60	37,57
Julio	12	21,57	55,63	0	5,35	0	45,21
Agosto	7	11,46	61,08	7	9,37	74,70	69,57
Septiembre	14	53	26,41	3	28	10,71	17,28
Octubre	12	23,67	50,69	6	14,92	40,21	47,55
Noviembre	1	6,19	16,15	0	10,69	0	5,97
Dic-Ene	2	7,64	26,17	1	8,91	11,22	18,13
Febrero	0	4,34	0	0	0,9	0	0
Abril	1	7,13	14,02	1	4,91	20,36	16,34
Mayo	6	11,58	51,81	1	6,61	15,13	38,5

#### 4.4 Discusión

*C. pyri* es, al igual que en otros países (Lemoine, 1984; Carraro *et al.*, 1998), transmisor del fitoplasma de PD en España. Como en otras zonas mediterráneas, es la especie más extendida en los cultivos de peral (Lemoine, 1984; Stratopoulou & Kapatou, 1995; Carraro *et al.*, 2001) y por tanto, es el vector principal de este fitoplasma en nuestro país.

*C. pyri* presentó un patrón de infección estacional, que coincide con el de la detección estacional del fitoplasma en perales del área mediterránea (capítulo 3): de Junio a Agosto los porcentajes de infección se mantuvieron constantes. En Septiembre se obtuvo la máxima detección, coincidiendo con el periodo de mayor distribución del fitoplasma en el árbol (Seemüller *et al.*, 1984). En Octubre, mes en el que emerge la generación de invierno, los porcentajes de psilas portadoras de fitoplasma disminuyeron ligeramente. En Noviembre, el porcentaje de psilas infectadas descendió a un 16%, debido probablemente a que las generaciones de psila de verano habían desaparecido y, no existen datos que en psila haya transmisión vertical del fitoplasma. Durante el invierno, el fitoplasma es difícilmente accesible en la planta (Seemüller *et al.*, 1984) y las psilas, al encontrarse en diapausa, suelen alimentarse menos (Ullman & McLean, 1988a). En estas condiciones, un elevado porcentaje de las psilas se mantuvieron libres de fitoplasma. Se han obtenido patrones de infección similares en otras zonas mediterráneas (Carraro *et al.*, 2001) y en Inglaterra (Davies *et al.*, 1998), pero no en Norte América (Blomquist & Kirkpatrick, 2002). Esto sugiere que, factores ecológicos y geográficos estarían influyendo en el patrón de infección del vector y, por consiguiente, también en la transmisión.

Ambos géneros manifestaron la misma capacidad de adquirir el fitoplasma, indicando que posiblemente ambos sexos se alimenten de la misma parte de la planta y tejido (Ullman & McLean, 1988a, Ullman & McLean, 1988 b). Estos resultados contrastan con los obtenidos con el fitoplasma AY, transmitido por *Macrostelus quadrilineatus* (Beanland *et al.*, 1999). Beanland y sus colaboradores observaron mayor número de machos infectados que hembras, atribuible a posibles diferencias fisiológicas y de comportamiento entre sexos.

En este estudio, se ha demostrado que el medio nutritivo utilizado en el ensayo es adecuado para analizar la capacidad de las psilas para transmitir el fitoplasma. Durante casi todos los meses se obtuvieron medios PCR-positivos, lo que indica que *C. pyri* podía

atravesar con su estilete el parafilm para alimentarse, y que el medio rico en sacarosa era apetecible para el vector. Así, este método, se presenta como alternativa a los ensayos de transmisión a plantas, mucho más largos, ya que incluyen un periodo de contacto del vector con el fitoplasma en la planta sana, y una segunda fase, de varios meses, para que el fitoplasma se desarrolle en la planta utilizada para la transmisión. Durante el mes de Febrero se registraron los valores más bajos de psilas portadoras de fitoplasma, hecho que se vio reflejado en la transmisión, que fue nula. Durante el resto del año hubo transmisión, aunque los porcentajes no fueron demasiado elevados. Concretamente, en Septiembre, cuando en todos los grupos de psilas se identificó el fitoplasma, el porcentaje de medios nutritivos a los que las psilas infectadas transmitieron el fitoplasma no superó el 17,3%. Este hecho podría deberse a errores de manipulación del medio, así como a que hubiese un importante porcentaje de psilas que hubiesen emergido y aún y habiendo adquirido el fitoplasma, estos no habrían tenido tiempo de multiplicarse (Lefol *et al.*, 1994; Cousin, 1995). En estas condiciones, las psilas no fueron capaces de transmitir el fitoplasma.

Destacar también que, las psilas invernales transmitieron el fitoplasma al medio nutritivo en condiciones de laboratorio, dato que confirma que durante la diapausa, son capaces de mantener el fitoplasma e infectar los nuevos brotes con la llegada de la primavera (Davies *et al.*, 1998; Carraro *et al.*, 2001; Blomquist & Kirkpatrick, 2002).

Según el género de la psila, la efectividad en la transmisión del fitoplasma de PD varió, debido, probablemente, a los diferentes hábitos alimenticios existentes entre ambos sexos. En *C. pyricola* y *C. melanoneura*, los machos, con el fin de emparejarse, visitan más plantas que las hembras (Horton, 1994; Tedeschi *et al.*, 2002). Como consecuencia, los machos no comen en un árbol el suficiente tiempo como para transmitir el fitoplasma con tanta eficiencia (Beanland *et al.*, 1999). Por otro lado, las hembras, para la producción de huevos y su ovoposición, tienen una mayor demanda de nutrientes (Swenson, 1971) y muestran menor tendencia a la movilidad (Horton, 1994). Debido a ambos factores, las hembras podrían estar durante más tiempo alimentándose sobre una misma planta y, por lo tanto, aumentar las posibilidades de transmitir el fitoplasma al árbol. Estos hábitos alimenticios se habrían mantenido en los tubos con medio artificial. Se han descrito también las mismas diferencias en la transmisión del fitoplasma de AY según el sexo en *Macrostelus quadrilineatus* (Beanland *et al.*, 1999).

Si consideramos los resultados de la sex ratio obtenidos durante el año de estudio, con proporciones muy similares a las descritas en estudios anteriores (Priore, 1991; Lyoussoufi *et al.*, 1994; Stratopoulou & kpatos, 1995), la diferencia en la eficacia de transmisión

según el sexo, adquiere aún mayor importancia. Durante casi todo el año, la proporción de hembras fue superior a la de los machos, como consecuencia de la mayor mortalidad de éstos (Lyoussoufi *et al.*, 1994; Stratopoulou & Kapatos, 1995). Tan sólo durante los picos de emergencia de nuevas generaciones de psila y, durante el invierno, cuando la mortalidad es similar para ambos sexos (Stratopoulou & Kapatos, 1995), la sex ratio se aproximó a 1:1. Por lo tanto, ante la evidencia de la mayor presencia de hembras en el árbol, y dado que éstas transmiten con mayor eficacia el fitoplasma, deberían aplicarse medidas de investigación dirigidas al control de las hembras.

En este capítulo se ha presentado a *C. pyri* como el vector principal del fitoplasma de PD, en España. Se ha observado como machos y hembras tienen la misma capacidad de adquirir el fitoplasma, y sin embargo, las hembras lo transmiten más fácilmente. Los resultados presentes deberían tenerse en cuenta en futuras estrategias para controlar la enfermedad.

#### 4.5 Bibliografía

- Ahrens, U., Seemüller, E., 1992. Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology* 82, 828-832.
- Avinent, L., Llacer, G., Almacellas, J., Torá, R., 1997. Pear decline in Spain. *Plant Pathol.* 46, 694-698.
- Battle, A., Laviña, A., Marta, F., Medina, V., 1999. Incidencia y detección del fitoplasma asociado al decaimiento del peral en la provincia de Lérida. *Phytoma* 114, 181-183.
- Beanland, L., Hoy, C.W., Miller, S.A., Nault, L.R., 1999. Leafhopper (Homoptera:Cicadellidae) transmission of Aster Yellows phytoplasma: Does gender matter?. *Environ. Entomol.* 28 (6), 1101-1106.
- Berrada, S., Fournier, D., Cuany, A., Nguyen, T.X., 1994. Identification of resistance mechanisms in a selected laboratory strain of *Cacopsylla pyri* (Homoptera: Psyllidae): altered acetylcholinesterase and detoxifying oxidases. *Pest. Biochem. Physiol.* 48, 41-47.
- Blomquist, C.L., Kirkpatrick, B.C., 2002. Frequency and seasonal distribution of pear psylla infected with the pear decline phytoplasma in California pear orchards. *Phytopathol.* 92 (11), 1218-1226.
- Buès, R., Boudinhon, L., Toubon, J.F., Faivre D'Arcier F., 1999. Geographic and seasonal variability of resistance to insecticides in *Cacopsylla pyri* L. (Hom.: Psyllidae). *J. Appl. Ent.* 123, 289-297.

- Burts, E.C., Retan, H., 1973. Detection of pear psylla. Wash. State Univ. Ext. Mimeo 3069. 2pp.
- Carraro, L., Loi, N., Ermacora, P., 2001. The "lyfe cycle" of pear decline phytoplasma in the vector *Cacopsylla pyri*. J. Plant Pathol. 83 (2), 87-90.
- Carraro, L., Loi, N., Ermacora, P., Gregoris, A., Osler, R., 1998. Transmission of pear decline by using naturally infected *Cacopsylla pyri*. Acta Hortic. 472, 665-668.
- Cousin, M., 1995. Phytoplasmas and phytoplasma diseases. Agronomie. 15, 245-264.
- Davies, D.L., Clark, M.F., Adams, N.A., 1998. The epidemiology of pear decline in the UK. Acta Hortic. 472, 669-672.
- Davies, D.L., Guise, C.M., Clark, M.F., Adams, N.A., 1992. Parry's disease of pears is similar to pear decline and associated with mycoplasma-like organisms transmitted by *Cacopsylla pyricola*. Plant Pathol. 41, 194-203.
- Deng, S., Hiruki, C., 1991. Amplification of 16s rRNA genes from culturable and non-culturable mollicutes. J. Microbiol. Meth. 14, 53-61.
- Fletcher, J., Wayadande, A., Melcher, U., Ye, F., 1998. The phytopathogenic mollicute-insect vector interface: a closer look. Phytopathology, 88 (12), 1351-1358.
- Follett, P.A., Croft, B.A., Westgard, P.H., 1985. Regional resistance to insecticides in *Psylla pyricola* from pear orchards in Oregon. Can. Ent. 117, 565-573.
- Hibino, H., Kaloostian, G.H., Schneider, H., 1971. Mycoplasma bodies in the pear psylla vector of pear decline. Virology 43, 33-40.
- Horton, D.R., Burts, E.C., Unruh, T.R., Krysan, J.L., Coop, L.B., Croft, B.A., 1994. Phenology of fall dispersal by winterform pear psylla (Homoptera: Psyllidae) in relation to leaf fall and weather. Can. Entomol. 126 (1), 111-120.
- Hughes, G., Gottwald, T.R., Garnsey, S.M., 2001. Development of methods and models and their application to disease problems in the perennial citrus crop system. In: Biotic interactions in plant-pathogen associations (eds. M. J. Jegger and N. J. Spence). CAB International. 307-329.
- Jensen, D.D., Griggs, W.H., Gonzales, C.Q., Schneider, H., 1964. Pear decline virus transmission by pear psylla. Phytopathology 54, 1346-1351.
- Kapatos E.T., Stratopoulou E.T., 1999. Duration times of the immature stages of *Cacopsylla pyri* L. (Hom., Psyllidae), estimated under field conditions, and their relationship to ambient temperature. J. Appl. Ent. 123, 555-559.
- Lefol, C., Lherminier, J., Boudon-Padiou, E., Larrue, J., Louis, C., Caudwell, A., 1994. Propagation of Flavescence dorée MLO (mycoplasma-like organism) in the leafhopper vector *Euscelidius variegatus* Kbm. J. Invert. Pathol. 63, 285-293.
- Lee, I-M., Davis, R.E., Gundersen-Rindal, D.E., 2000. Phytoplasma: Phytopathogenic mollicutes. A. Rev. Microbiol. 54, 221-255.
- Lemoine, J., 1984. Is *Psylla pyri* a vector of pear decline in France? Bulletin-SROP. 1984, 7 (5), 245-251.

- Lemoine, L., 1991. Deperissement du poirier: role de *Psylla pyri* dans sa dissemination. Arboric. Fruit. 442, 28-32.
- Lorenz, K.H., Schneider, B., Ahrens, U., Seemüller, E., 1995. Detection of the apple proliferation and pear decline phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and non-ribosomal DNA. Phytopathology. 85, 771-776.
- Lyousoufi, A., Gadenne, C., Faivre-d-Arcier, F., 1994. Evolution de la diapause dy psylle du poirier *Cacopsylla pyri* dans les conditions naturelles. Entomol. Exp. Appl. 70 (2), 193-199.
- Priore, R., 1991. Biological observations on the pear psyllid (*Cacopsylla pyri* L.) in Campania (1986-1988). Inform. Fitopatol. 41 (3), 57-61.
- Sarasúa, M.J., Avila, J., Artigues, M., Jauset, A.M., 1999. Estrategia de control de la psylla del peral, *Cacopsylla pyri* (L.), para el desarrollo de un programa de control integrado en peral. Phytoma España 114, 86-88.
- Schneider, B., Seemüller, E., Smart, C. D., Kirkpatrick, B. C., 1995. Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasmalike organisms or phytoplasmas. In: Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmaology, Vol. 2. Ed. by Razin, S.; Tully, J. G. New York: Academic Press, pp. 369-380.
- Seemüller E., Schaper, U., Zimmermann, E., 1984. Seasonal variation in the colonization patterns of mycoplasmalike organisms associated with apple proliferation and pear decline. J. Plant Dis. Protect. 91, 371-382.
- Souliotis, C., Broumas, T., 1990: Etude de la bioecologie de psylle du poirier (*Cacopsylla pyri* L.) à Larissa. Greece. Bull. OILB/SROP. 13 (1), 29-37.
- Souliotis, C., Broumas, T., 1998. Study of the population dynamics of the *Cacopsylla pyri* L. (Homoptera: Psyllidae) and its predators in Eastern Attiki. Ann. Inst Phytopathol. Benaki (N.S.) 18, 97-109.
- Stratopoulou, E.T., Kapatos, E.T., 1995. The dynamics of the adult population of pear psylla, *Cacopsylla pyri* L. (Hom., Psyllidae) in the region of Magnesia (Greece). J. Appl. Ent. 119, 97-101.
- Swenson, K.G., 1971. Relation of age, sex and mating of *Macrosteles fascifrons* to transmission of Aster yellows. Phytopathology 61, 657-659.
- Tanne, E., Boudon-Padieu, E., Clair, D., Davidovich, M., Melamed, S., Klein M., 2001. Detection of phytoplasma by polimerase chain reaction of insect feeding medium and its use in determining vectoring ability. Phytopathology, 91(8), 741-746.
- Tedeschi, R., Bosco, D., Alma, A., 2002. Population dynamics of *Cacopsylla melanoneura* (Homoptera:Psyllidae), a vector of Apple proliferation phytoplasma in Northwestern Italy. J. Econ. Entomol. 95(3), 544-551.

- Ullman, D.E., McLean, D.L., 1988 a. Feeding behaviour of the winter-form pear psylla, *Psylla pyricola* (Homoptera:Psyllidae), on reproductive and transitory host plants. Environ. Entomol. 17 (4), 675-678.
- Ullman, D.E., McLean, D.L., 1988 b. The probing behaviour of the summer-form pear psylla. Entomol. Exp.Appl. 47, 115-125.

# 5

## Clonación y estudio del genoma del fitoplasma del Decaimiento del peral

### Resumen

Se ha puesto a punto una técnica para separar el ADN del genoma de los fitoplasmas, del de las plantas que los hospedan. El procedimiento consistió en realizar primero una extracción del ADN total de la planta infectada. Seguidamente, por centrifugación en gradiente de CICs-bisbenzimidida se separaron parcialmente ambos ADNs, gracias al alto contenido en A+T de los fitoplasmas en comparación con el de las plantas huésped. La fracción con mayor porcentaje de ADN del fitoplasma se digirió con la enzima de restricción *AseI*, capaz de reconocer secuencias ricas en A/T. La digestión originó fragmentos de ADN fitoplasmáticos, más pequeños que los de planta, los cuales se amplifican preferentemente mediante PCR. Los productos de amplificación fueron clonados y analizados mediante hibridación por dot.blot.

Los resultados muestran que un 90% de los clones recombinantes contenían ADN de fitoplasma. Por secuenciación y comparación con el banco de datos de NCBI fue confirmado el origen bacteriano de las secuencias, a las cuales se les asignó una función putativa. Finalmente mediante el diseño de cebadores para alguna de estas secuencias y posterior análisis por PCR se corroboró que los fragmentos de ADN clonados eran fitoplasmáticos. Este método podría ser de utilidad para futuras comparaciones entre genomas de distintos fitoplasmas.

*Palabras clave:* micoplasma, comparación de genomas, mollicute, PCR.

## 5.1 Introducción

Hasta el momento, los fitoplasmas no han podido ser cultivados en medios axénicos y su multiplicación está limitada al floema de la planta y a los insectos vectores. Así, las técnicas de PCR y RFLP son las más utilizadas para la detección y caracterización de estos microorganismos, usando en la mayoría de casos el gen ribosómico 16S rRNA y la región espaciadora 16/23S como marcadores para análisis taxonómicos y filogenéticos (Lee *et al.*, 1998; Seemüller *et al.*, 1998).

En los últimos años se está aplicando en los fitoplasmas la tecnología del ADN recombinante: se han desarrollado diferentes técnicas para clonar su ADN, como son la centrifugación en gradiente de ClCs-bromuro de etidio con filtración y absorción cruzada con anticuerpos (Kirkpatrick *et al.*, 1987), la centrifugación en gradiente de CsCl-bisbenzimidaz (Kollar *et al.*, 1990), los RAPDs (Chen & Chen, 1995) y la electroforesis en campo pulsante (Liefing & Kirkpatrick, 2003). Mediante el uso de estas técnicas se han clonado fragmentos de ADN cromosómicos y extra cromosómicos, algunos de los cuales se han utilizado para la síntesis de sondas, que detectan los fitoplasmas en plantas e insectos (Boudon- Padieu *et al.*, 1989; Bertaccini *et al.*, 1990; Chen *et al.*, 1992; Blomquist & Kirkpatrick, 2002), así como también se han utilizado para analizar las relaciones genéticas existentes entre los fitoplasmas (Deng & Hiruki, 1991; Kuske *et al.*, 1991; Davis *et al.*, 1993; Kuan & Su, 1998). Además, en la mayoría de casos se ha podido identificar para qué codifican estos fragmentos de ADN clonados, como son las DNA girasas (Chuang & Lin, 2000), proteínas de translocación (Kakizawa *et al.*, 2001) y proteínas de membrana (Blomquist *et al.*, 2001; Mergenthaler *et al.*, 2001; Morton *et al.*, 2003) entre otros. A pesar de todo, la mayoría de estas técnicas han tenido una baja eficiencia de clonación para el ADN de fitoplasma o implican procesos largos y costosos.

En el presente apartado se pone a punto una nueva estrategia para el aislamiento específico del ADN del fitoplasma a partir de planta infectada, teniendo en cuenta el diferente contenido en A/T existente entre ambos organismos.

## 5.2 Material y métodos

### 5.2.1 Distribución teórica de las longitudes de los fragmentos de ADN de los genomas de *Mycoplasma pulmonis* y *Arabidopsis thaliana*, tras la digestión con la enzima de restricción *AseI*

Se utilizaron los genomas de *Mycoplasma pulmonis* (organismo con contenido GC similar al de fitoplasmas) y *Arabidopsis thaliana*, disponibles en la base de datos NCBI. Se calculó la distribución hipotética de las longitudes de los fragmentos obtenidos de ambos, tras digerir con la enzima de restricción *Ase I*. Esta distribución, permitió extrapolar la longitud de los fragmentos que podríamos conseguir al digerir el ADN de vinca infectada con el fitoplasma de PD.

### 5.2.2 Material vegetal

Se utilizaron plantas de vinca (*Catharanthus roseus*) infectadas con el fitoplasma de PD. Estas plantas fueron propagadas y mantenidas en invernaderos libres de insectos con el fin de evitar la expansión de la enfermedad a otros posibles cultivos.

### 5.2.3 Extracción de ácidos nucleicos y tratamiento con RNAasa

A partir de 30 gramos de nervadura de vinca infectada con el fitoplasma de PD, se realizó una extracción de ácidos nucleicos totales según la metodología indicada por Doyle & Doyle (1990). Los ácidos nucleicos resultantes fueron tratados con RNAasa (1h a 37°C, 0.2 mg/ ml) seguido de una extracción con cloroformo-isoamil alcohol.

### 5.2.4 Separación del ADN fitoplasmático por centrifugación en gradiente de CICs y en presencia de bisbenzimidida.

Mediante el método descrito por Kollar *et al.*, (1990), se separaron parcialmente el ADN del fitoplasma del ADN del huésped por centrifugación en gradiente de CICs-bisbenzimidida. Para ello, se realizó una centrifugación en una ultracentrífuga Beckman L8-50M/E a 40000 rpm durante 36 horas con 1,1g/ml de CICs y 150 µg/ml de bisbenzimidida

(Hoechst 33258; Serva). Tras la centrifugación, se recuperaron las bandas de ADN, y los restos de bisbenzimidazoles se eliminaron por centrifugación con N-butyl alcohol saturado. El CICs fue eliminado por diálisis (Spectrum Laboratories) y el ADN se precipitó con 1/10 acetato sódico (3M) y dos volúmenes de etanol 95%.

### **5.2.5 PCR competitiva**

Para averiguar cual era la banda con mayor proporción de ADN fitoplasmático, se realizó una PCR competitiva, siguiendo la metodología descrita por Palmano (2001). Se utilizó como muestra de ADN de concentración conocida el plásmido vector pUC19 (49 ng/  $\mu$ l), al que se le incluyó un fragmento de ADN perteneciente al fitoplasma TWB, del grupo AY (Pressaco & Firrao, 1999). La longitud de los fragmentos de ADN, resultantes de la amplificación para los fitoplasmas TWB y PD, son de 221pb y 194pb respectivamente.

En un volumen total de 40  $\mu$ l, se añadieron 50-100ng del ADN purificado, los cebadores 16ENDF y TMOD a una concentración de 0,125  $\mu$ M, 2 U de Taq polimerasa (6U/  $\mu$ l), 150  $\mu$ M de dNTPs, 4  $\mu$ l de tampón para Taq 10X (15 mM  $\text{Cl}_2\text{Mg}$ ; 100 mM Tris-HCl (pH 9); 500 mM KCl; 1,1% de gelatina) y 1,5 mM de  $\text{Cl}_2\text{Mg}$ . La reacción de amplificación se realizó en un termociclador Techne (Genius) y las condiciones fueron 2 min a 95°C; seguido de 35 ciclos de 20 s a 94°C; 40 s a 55°C y 40 s a 72°C. La elongación final fue de 10 min a 72°C.

### **5.2.6 Preparación del ADN del fitoplasma**

A partir del ADN procedente de la fracción con mayor enriquecimiento de fitoplasma, se desarrollaron AFLPs según Kinzler & Vogelstein (1989), con algunas modificaciones:

#### 5.2.6.1 Digestión del ADN

En un volumen total de 20  $\mu$ l, se mezclaron 1  $\mu$ g de ADN, 10U (1 $\mu$ l) de la enzima de restricción *AseI* y 2  $\mu$ l del tampón para la enzima (Biolabs Inc.). La mezcla se incubó durante 3 h a 37 °C. El producto resultante se precipitó con etanol y fue diluido en 35  $\mu$ l de agua destilada estéril.

#### 5.2.6.2 Preparación de los adaptadores y condiciones de ligación

Los adaptadores no fosforilados ADA UNIV: 5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3' y ADA B: 3'-AGCATCTGACGCATGGAT-5' se mezclaron para obtener cantidades equimolares. En un volumen total de 50 µl se introdujeron el ADN tratado anteriormente, 2 U de T4 DNA ligasa, 5 µl del tampón 1X para la DNA ligasa (Promega) y 400 ng de los adaptadores. La mezcla se dejó incubando a 16°C durante toda la noche. El proceso de ligación se inactivó con 2 µl de EDTA 0,2 M y el ADN se precipitó con etanol y se se resolvió en 20 µl de H<sub>2</sub>O destilada estéril.

#### 5.2.6.3 Amplificación de los fragmentos de ADN

En un volumen total de 25 µl se mezclaron 2,5 µl del ADN ligado, 100 ng del cebador Ase (5'-GACTGCGTACCTAAT-3'), 3 Unidades de Taq polimerasa, 200 µM de dNTPs, y 2,5 µl de tampón para la Taq 10X (15 mM Cl<sub>2</sub>Mg; 100 mM Tris-HCl (pH 9); 500 mM KCl; 1,1% de gelatina). La amplificación se realizó en las siguientes condiciones: una desnaturalización inicial de 2 min a 95°C seguida de 30 ciclos con una desnaturalización de 60 s a 94°C, una hibridación de 60 s a 52°C y una elongación de 150 s a 72°C. La extensión final fue de 10 min a 72°C. Los fragmentos amplificados se purificaron por columna (QIA quick<sup>TM</sup>, PCR purification Kit , QIAGEN)

#### **5.2.7 Clonación de los productos de PCR**

Los fragmentos purificados se clonaron en el plásmido pGEM-T (Promega, P-Gem. T-easy vector) y se utilizaron para transformar células competentes de *Escherichia coli*, JM109 (Promega), siguiendo la metodología descrita por el proveedor (Promega). Alícuotas de células transformadas se sembraron en medio LB con X-gal e IPTG. Una PCR de las colonias positivas con los cebadores universales M13f/r sirvió para confirmar la presencia de los fragmentos clonados, así como su longitud.

En un volumen total de 50 µl, se añadieron 50-100 ng de ADN, 0,4 µM de los cebadores M13F y M13 R respectivamente, 0,5 µl de Taq polimerasa (6U/ µl), 400 µM de dNTPs, 5 µl del tampón para la Taq 10X (15 mM Cl<sub>2</sub>Mg; 100 mM Tris-HCl (pH 9); 500 mM KCl; 1,1% de gelatina), y 1,5 mM de Cl<sub>2</sub>Mg. La amplificación se realizó en un termociclador Techne (Genius) con una desnaturalización inicial de 2 min a 95°C, seguido

de 35 ciclos de 30 s a 94°C; 30 s a 52°C y 3 min. a 72°C . La extensión final fue de 10 min. a 72°C.

### **5.2.8 Hibridación mediante la técnica de dot.blot para la selección de los clones con ADN fitoplasmático**

#### 5.2.8.1 Hibridación directa

Se analizó la procedencia del ADN de 150 fragmentos clonados. Se utilizaron dos sondas marcadas con digoxigenina para identificar los clones transformados; una con ADN de vinca sana y la otra con ADN de vinca infectada con el fitoplasma de PD. Para la construcción de las sondas, se realizó una extracción de ácidos nucleicos a partir de la nervadura de ambas vincas, según el método de Doyle & Doyle (1990). El ADN total de cada planta fue digerido por separado con la enzima de restricción *AseI* y marcado con digoxigenina (Dig-High-Prime, Roche). Dos microlitros de cada uno de los 150 insertos obtenidos mediante PCR, fueron depositados paralelamente en 2 membranas de nylon cargadas positivamente (Roche) y fijados por incubación en una estufa a 120°C durante 30 min. Las membranas se introdujeron en un tampón de pre-hibridación 6X SSC (1X SSC= 150 mM NaCl, 15 mM citrato sódico, pH 7); 0,1% N-lauril sarcosina, 0,02% SDS; Blocking reagent 2% (Roche) y 50 % de formamida durante un mínimo de 2 horas a 60°C de temperatura. La hibridación se realizó durante toda la noche en las mismas condiciones que la pre-hibridación, añadiendo 50 ng / ml de la sonda marcada con digoxigenina, previamente desnaturalizada. Terminada la hibridación, se realizaron 2 lavados de astringencia de 5 min a temperatura ambiente con tampón lavador 1 (2X SSC; SDS 0,1%), 2 lavados de 15min con tampón lavador 2 (0,1X SSC; 0,1% SDS) a 60°C y 2 lavados de 5 min con tampón maleato (0,1M ácido maleico; 0,15M NaCl pH 7.5) y Tween 20 al 0,3%. La hibridación se visualizó mediante el sustrato quimioluminiscente CSPD, siguiendo las instrucciones del proveedor (Roche).

#### 5.2.8.2 Hibridación inversa

Se seleccionaron 47 clones al azar para ser utilizados como sondas. Con cada uno de los clones se realizó una PCR usando los cebadores M13f/r. Durante la amplificación se incorporó la digoxigenina (Digoxigenin-11-dUTP) a los fragmentos de ADN

(Digoxigenina 11 dUTP alkal-stabile, Roche). Cada uno de los amplicones marcados fue utilizado para una posterior hibridación, empleando como ADN fijado a la membrana, 100 ng de ADN de vinca sana y 100 ng de ADN de vinca infectada con el fitoplasma de PD. La hibridación se hizo en las mismas condiciones que en el apartado anterior.

### 5.2.9 Secuenciación

Los clones seleccionados se purificaron (High Pure Plasmid isolation, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) y secuenciaron en un secuenciador Perkin-Elmer ABI Prism 377 utilizando dideoxinucleótidos terminadores (Sanger *et al.*, 1977) “BigDye™ Terminator Kit”. Las secuencias de ADN se compararon con las secuencias disponibles en la base de datos NCBI utilizando el programa BLAST (Altschul *et al.*, 1990).

### 5.2.10 Síntesis de cebadores de las secuencias obtenidas

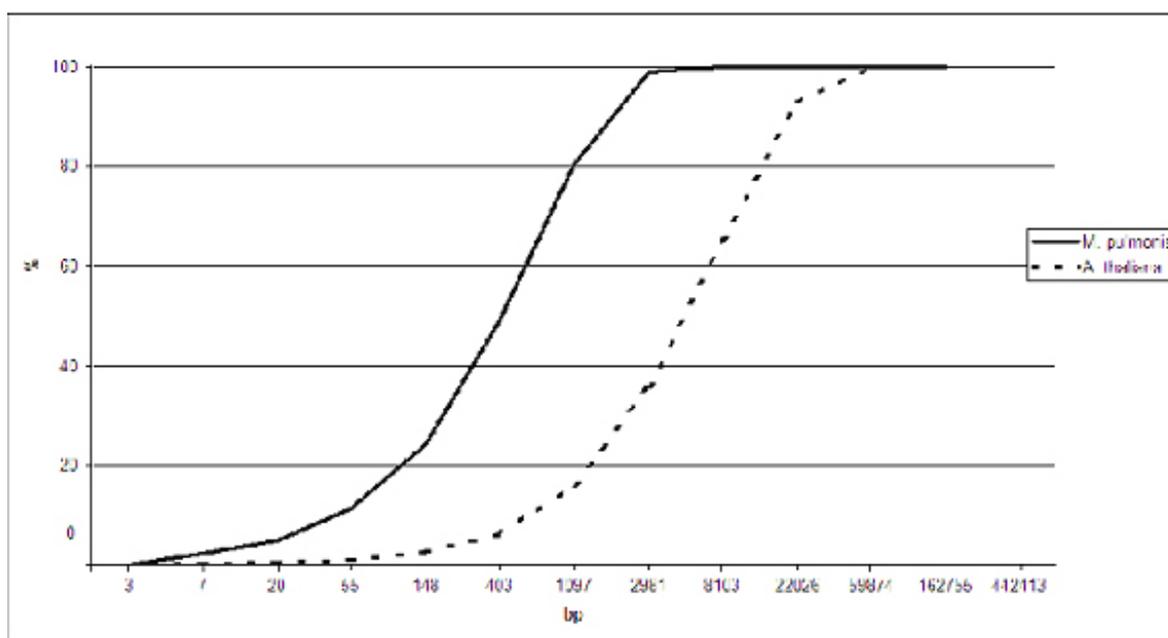
De las secuencias obtenidas, se escogieron 20 para diseñar, con el programa Primer Premier, 1 ó 2 pares de cebadores por secuencia (<http://www.premierbiosoft.com/primerdesign/primerdesign.html>). Con cada par de cebadores se realizaron 2 reacciones de PCR a unas temperaturas de anillamiento de 47°C, 50°C, 55°C ó 60°C. Las temperaturas escogidas fueron las 2 más cercanas a las temperaturas teóricas indicadas en el programa.

En un volumen total de 25 µl, se introdujeron 100 ng de ADN de vinca (sana o infectada con el fitoplasma de PD), 100 ng de cada cebador, 0,5 µl de Taq polimerasa (6U/µl), 150 µM de cada dNTP, tampón de PCR 1X (Roche). La amplificación se llevó a cabo en un termociclador Techne (Genius) con una desnaturalización inicial de 120 s a 95°C y 35 ciclos con una desnaturalización de 30 s a 95°C, hibridación de 75 s, y elongación de 90 s a 72°C. La extensión final fue de 10 min. a 72°C.

## 5.3 Resultados

### 5.3.1 Distribución teórica de las longitudes de los fragmentos de ADN de los genomas de *Mycoplasma pulmonis* y *Arabidopsis thaliana* tras la digestión con la enzima de restricción *AseI*

Según el modelo teórico, con la enzima de restricción *AseI* el genoma de *M. pulmonis* se digiere en 5.205 fragmentos, presentando mayor frecuencia de digestión en comparación con el genoma de *A. thaliana* (1.492 fragmentos), unas 150 veces más largo que el genoma de *M. pulmonis*. Además, los fragmentos resultantes de *Mycoplasma* han sido mucho más pequeños en longitud. La Figura 5.1 muestra los porcentajes acumulados de los fragmentos generados por *AseI* en función del logaritmo de su longitud (pb). Se observa que en el caso de *M. pulmonis*, la mayoría de fragmentos tienen una longitud menor de 1000 pb (80%). En cambio, tan sólo un 15% de los fragmentos de *A. thaliana* tienen esta longitud. Debido al hecho que la PCR suele amplificar preferentemente fragmentos pequeños, es de esperar que en una amplificación donde se encuentre ADN cortado de vinca y fitoplasma, los fragmentos de este último se amplifiquen con mayor facilidad.

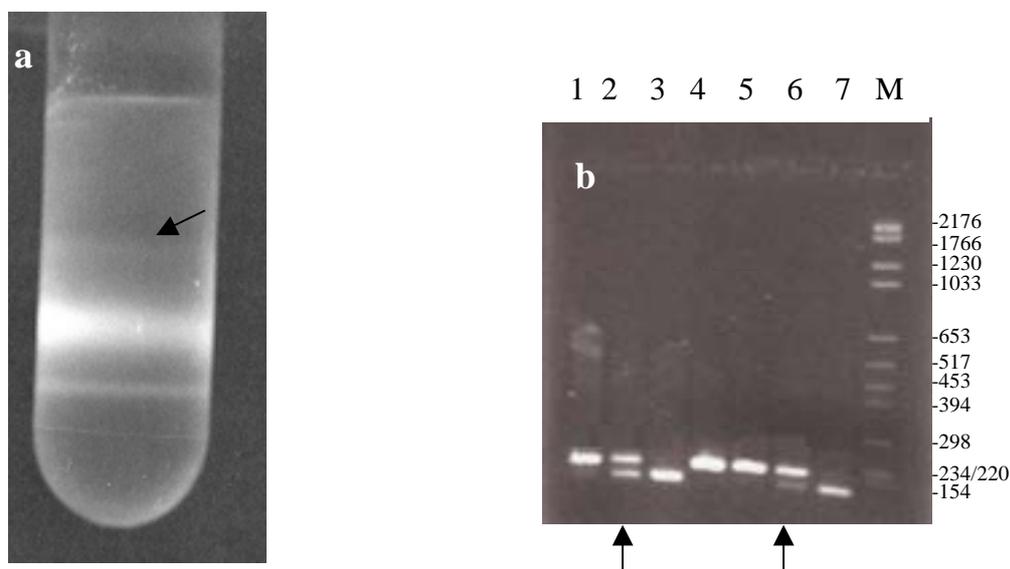


**Figura 5.1-** Comparación de los genomas de *Arabidopsis thaliana* (125Mb) y *Mycoplasma pulmonis* (aprox. 964 Kb), según los porcentajes acumulativos de los fragmentos generados por *AseI* versus el logaritmo de su longitud (pb).

### 5.3.2 Separación del ADN fitoplasmático por centrifugación en gradiente de CICs y en presencia de bisbenzimidida.

Tras someter el ADN de vinca infectada con fitoplasma de PD a un gradiente de CICs-bisbenzimidida, se observó una banda principal de ADN, y en la parte superior del gradiente (de menor densidad), otra banda muy fina (Figura 5.2.a)

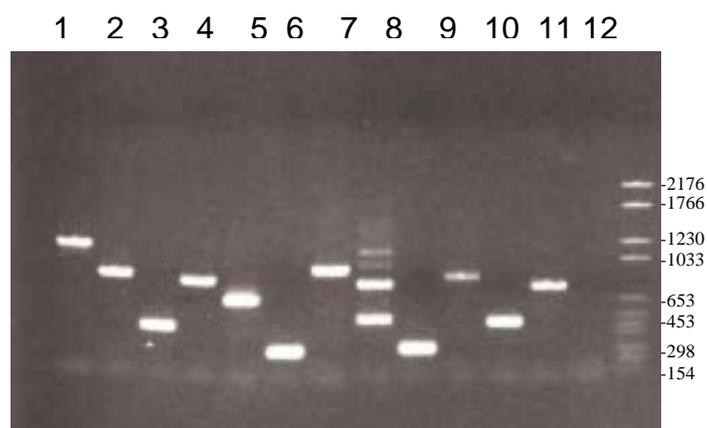
Con los resultados del análisis por PCR competitiva se calculó que 190 ng de ADN de la banda principal y 100 ng de la banda superior eran de origen fitoplasmático (fig.5.2.b). Teniendo en cuenta que la banda principal contenía 50  $\mu$ g de ADN total, tan sólo un 0,2% era ADN de fitoplasma. En cambio, la banda superior, con 0,5  $\mu$ g de ADN total, contenía un 20% de ADN de fitoplasma. Los estudios posteriores se realizaron con ADN de la banda superior.



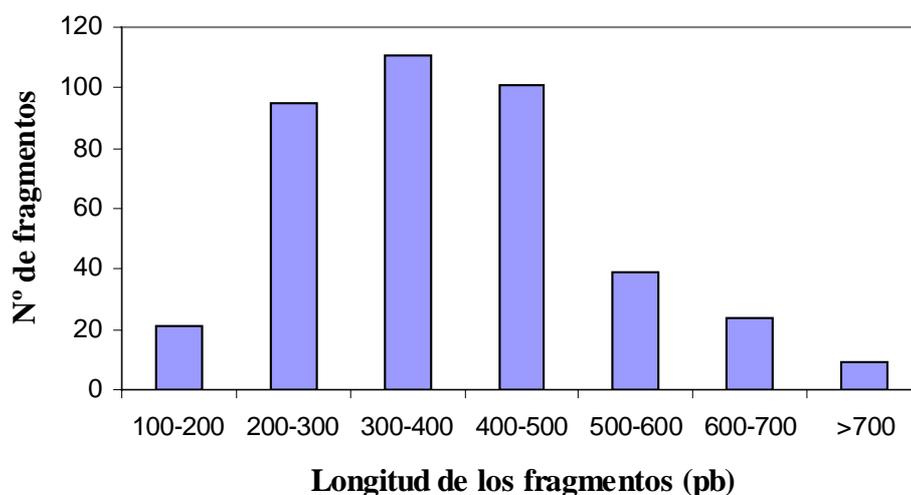
**Figura 5.2. a-** Resultado de la centrifugación por gradiente de CsCl-bisbenzimidida del ADN procedente de 30 g de vinca infectada con el fitoplasma de PD. La flecha señala la banda de ADN escogida. **b-** Electroforesis del resultado de la PCR competitiva con los cebadores TMOD y 16 End F. Muestras: 1-3: diluciones de TWB (1:10; 1:100 y 1:1000 respectivamente) con ADN de la banda superior. 4-7: diluciones de TWB (1:10; 1:100, 1:1000 y 1:10000 respectivamente) con ADN de la banda principal. Marcador molecular: Marker VI. Las flechas indican el vial en el que la concentración de ADN del fitoplasma TWB y del fitoplasma de PD es la misma.

### 5.3.3 Amplificación del ADN y clonación

Con la banda de ADN escogido y después de realizar la digestión, ligación a los adaptadores y amplificación, se obtuvo un producto de PCR formado por fragmentos de diferente tamaño que se purificó y clonó. Se obtuvieron alrededor de 400 colonias transformadas, que mediante amplificación por PCR dieron una longitud de fragmentos de inserción de entre 100 y 2000 pb, la mayoría de ellos de unos 500 pb (Figuras 5.3 y 5.4).



**Figura 5.3-** Electroforesis del resultado de la amplificación por PCR del ADN de 12 colonias de *E. coli* transformadas (líneas 1-12), utilizando los cebadores M13F/M13R. 13: control negativo, *E. Coli* sin transformar. Marcador molecular: Marker VI (Roche)



**Figura 5.4-** Longitud (pb) de los fragmentos clonados mediante transformación

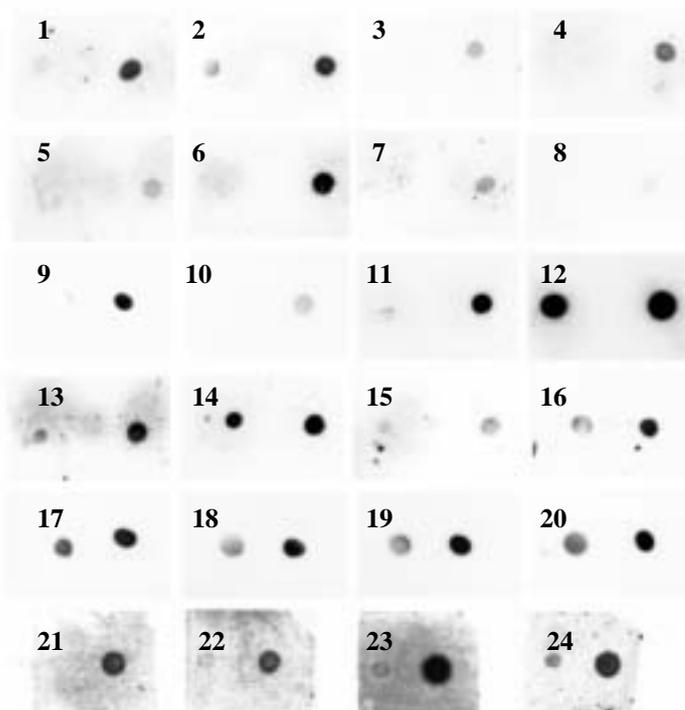
### 5.3.4 Análisis por hibridación de las colonias recombinantes

#### 5.3.4.1 Hibridación directa

Utilizando las sondas de ADN de vinca sana e infectada, no se pudieron distinguir los clones portadores de ADN de fitoplasma y de vinca, debido a que con ambas sondas se obtuvo la misma señal de hibridación para cada uno de los clones.

#### 5.3.4.2 Hibridación inversa

Con esta hibridación se identificaron 42 de 47 clones como portadores de ADN fitoplasmático (Figura 5.5). El resto de clones hibridaron tanto con ADN de vinca sana como de vinca infectada.



**Figura 5.5-** Resultado de la hibridación con vinca sana (izquierda) y vinca infectada (derecha), utilizando como sonda 24 clones diferentes.

### 5.3.5 Análisis de la secuenciación

Se secuenciaron los 47 fragmentos utilizados en el dot.blot inverso. Las secuencias obtenidas se compararon con las disponibles en NCBI mediante el programa BLAST. En la Tabla 5.1 se encuentran los resultados de la comparación.

La media obtenida del contenido en G+C de las secuencias (27.5%) confirma que la mayoría de los clones seleccionados pertenecen a ADN de fitoplasma (Kollar *et al.*, 1990). Sólo 1 secuencia de las 47 (2%) presentaba similitud con secuencias de planta (secuencia nº 1). Quince clones (32%) presentaron similitud con secuencias de otros microorganismos a los que se les asignó una función esperada. Una secuencia (2%) presentó similitud con ADN fitoplasmático y 5 clones (10,6%) fueron redundantes. Las 25 secuencias restantes (53%) no presentaron una homología significativa con ninguna de las secuencias publicadas hasta el momento.

**Tabla 5.1-** Resultado de la secuenciación y características de los 47 clones.

a- Longitud de los fragmentos clonados

b- Resultado de la hibridación por dot.blot. Se consideró una hibridación positiva cuando el marcaje resultante con ADN de vinca infectada fue mayor que con vinca sana.

c- Programa utilizado para comparar la secuencia de los fragmentos insertados con la base de datos del NCBI.

d- Organismo que mostró mayor homología con el fragmento insertado.

d- *E* values mayores de 1E-04 no fueron considerados como significativos.

Clonación del ADN del fitoplasma de PD

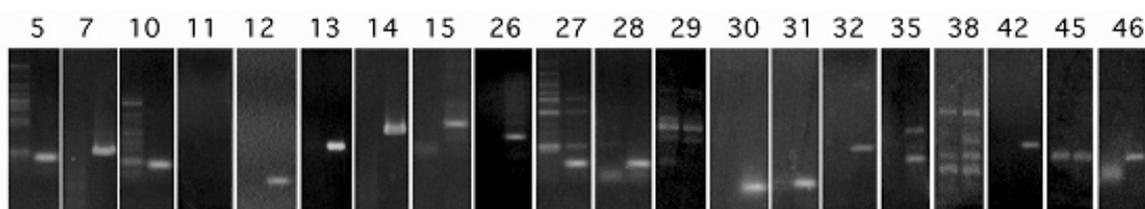
Clon	Longitud (bp) <sup>a</sup>	Hibridación por Dot blot <sup>b</sup>	Número de acceso	contenido en AT (%)	Programa <sup>c</sup>	Entrada del banco de datos con mayor similitud			
						Número de acceso	Descripción	Organismo	E value
1	340	+		70,58	Blast X	AP003216	Sim.chrom. 10. OSJNBa0090k04.8	Oryza sativa	3,00E-05
3	189	+	AJ583762	60,84	Blast N		Homología no significativa		
5	377	+		71,08	Blast X	AAC38188	DotG	Legionella pneumophila	1,00E-12
6	454	+	AJ583763	71,36	Blast X	AAC38188	DotG	Legionella pneumophila	2,00E-12
7	271	+	AJ583764	75,27	Blast X/N		Homología no significativa		
8	450	+	AJ583765	77,55	Blast X	AE007692	TldD protein fragment	Clostridium acetobutylicum	2,00E-06
9	352	+	AJ583766	65	Blast X	CAA47403	50S ribosomal protein L4	Geobac. stearothermophilus	6,00E-38
10	211	+	AJ583767	73,45	Blast X	CAA45367	50S ribosomal protein L13	Staphylococcus carnosus	3,00E-15
11	398	+	AJ583768	57,78	Blast X/N		Homología no significativa		
12	265	+	AJ583769	69,66	Blast X/N		Homología no significativa		
13	621	+	AJ583770	75,52	Blast X/N		Homología no significativa		
14	300	+	AJ583771	73,66	Blast X	AE001802	Peptide chain release factor RF-2	Thermotoga maritima	3,00E-27
15	310	+	AJ583772	75,16	Blast X	BAC44707	DNA polymerase III (alpha chain)	Mycoplasma penetrans	1,00E-12
16	510	+	AJ583773	69,21	Blast X	AAP07479	Prolyl-tRNA synthetase	Bacillus cereus	4,00E-51
17	510	+		69,21	Blast X	AAP07479	Prolyl-tRNA synthetase	Bacillus cereus	4,00E-51
18	242	+	AJ583774	73,96	Blast X	AAF30796	Conserved hypothetical proteine	Ureaplasma urealyticum	2,00E-14
19	377	+	AJ583775	76,65	Blast X	AAO03659	Copper-transporting ATPase copA	Staphylococcus epidermidis	6,00E-26
20	537	+	AJ583776	73,18	Blast X	ZP_00099073	Hypothetical protein	Desulfitobact. hafniniense	6,00E-30
21	422	+	AJ583777	76,3	Blast X	BAC13779	Ribosomal pseudouridylylate synthase	Oceanobacillus iheyensis	2,00E-07
22	457	+	AJ583778	76,8	Blast X	AE002128	Endonuclease IV	Ureaplasma urealyticum	5,00E-04
23	311	+	AJ583779	75,24	Blast X	BAB80085	Probable ABC transporter	Clostridium perfringens	3,00E-07
24	165	+	AJ583780	67,72	Blast N	MOU15224	Major SPWB-MLO antigen	Mycoplasma-like organism	3,00E-13
25	163	+		68,71	Blast N	MOU15224	Major SPWB-MLO antigen	Mycoplasma-like organism	5,00E-14
26	563	+		68,02	Blast N	MOU15224	Major SPWB-MLO antigen	Mycoplasma-like organism	7,00E-48
27	191	+	AJ583781	71,28	Blast N/X		Homología no significativa		
28	193	+	AJ583782	77,72	Blast N/X		Homología no significativa		
29	210	+		75,23	Blast N/X		Homología no significativa		
30	176	+	AJ583783	79,54	Blast N/X		Homología no significativa		
31	213	+	AJ583784	53	Blast N/X		Homología no significativa		
32	193	+	AJ583785	78,23	Blast N/X		Homología no significativa		
33	258	+	AJ583786	73,64	Blast N/X		Homología no significativa		
34	138	+	AJ583787	58	Blast N/X		Homología no significativa		
35	273	+	AJ583788	79,12	Blast N/X		Homología no significativa		
37	200	+	AJ583789	68,5	Blast N	AY013653	16S ribosomal RNA gene	Banisveld landfill bact.	9,00E-08
38	192	+		73,43	Blast N/X		Homología no significativa		
39	175	+	AJ583790	80,57	Blast N/X		Homología no significativa		
40	494	+	AJ583791	75,1	Blast N/X		Homología no significativa		
41	176	+	AJ583792	80,11	Blast N/X		Homología no significativa		
42	269	+	AJ583793	79,92	Blast N/X		Homología no significativa		
43	194	+	AJ583794	74,74	Blast N/X		Homología no significativa		
44	175	+	AJ583795	81,14	Blast N/X		Homología no significativa		
45	594	+		76,26	Blast N/X		Homología no significativa		
46	190	-	AJ583796	63,15	Blast N/X		Homología no significativa		
47	218	-	AJ583797	67,43	Blast X	BAB03868	50S ribosomal protein L6	Bacillus halodurans	8,00E-10
48	202	-		61,38	Blast N	MOU15224.04	Major SPWB-MLO antigen	Mycoplasma-like organism	2,00E-12
49	122	-		77,86	Blast N/X		Homología no significativa		
50	126	-		67,21	Blast N/X		Homología no significativa		

### 5.3.6 Síntesis de cebadores de las secuencias obtenidas

Con la finalidad, por una parte de corroborar que los fragmentos secuenciados pertenecían a fitoplasmas, y por otra para poder ser utilizados en posteriores análisis de variabilidad genética, se diseñaron cebadores para 20 fragmentos. En la tabla 5.2 se encuentran representados los 20 pares de cebadores diseñados, sus temperaturas de hibridación y los resultados de amplificación.

Con 16 pares de cebadores, se obtuvo una banda de amplificación del tamaño esperado con ADN de vinca infectada y no con vinca sana. Los clones 29, 38 y 45, generaron patrones de amplificación idénticos con extractos de ADN de vinca sana e infectada. Finalmente, con el par de cebadores correspondientes al clon 11 no hubo ningún tipo de amplificación. Debido a que no se buscaron las condiciones óptimas de PCR para cada caso, con algunos cebadores hubo amplificación muy baja y /o bandas adicionales de tamaños diferentes a las esperadas (Figura 5.6).

Destacar que de los 20 pares de cebadores diseñados, se escogió una secuencia que por dot.blot hibridaba con planta sana (clon 46). Esta secuencia amplificó específicamente con ADN de fitoplasma.



**Figura 5.6-** Electroforesis del resultado de la amplificación por PCR llevada a cabo con los cebadores indicados en la Tabla 5.2. Extractos de ADN de vinca sana (derecha) e infectada (izquierda)

**Tabla 5.2-** Resultado de la amplificación mediante PCR, con los cebadores diseñados para 16 de las secuencias seleccionadas por hibridación inversa como pertenecientes a genoma del fitoplasma.

Clon	Secuencia cebadores(5'-3')	Tamaño amplicon (bp)	Detección específica del amplicón	Temperatura de hibridación (°C)
5	TAATGGACATGGTGATTT	141	S	47
	TAGCCAGATTCTTTCAAATT			
7	GCGTTAACTTCAATTTTGGTTT	165	S	50
	AAAAATGGCACCTTATCAAAA			
10	AAATGGTTTATAGTTGATGC	127	S	47
	CAACAACAAAATCACCAC			
11	CCGCGATGATTAGTACACGA	207	N	50
	TGTGGAATTGTGAGCGGATA			
12	ACCTTAAAGAAGAAAAGATT	96	S	55
	TTTGAGTTGCTCCAGATT			
13	AGTTTAGTTATTGGGTGGTT	197	S	50
	GTCGATTGAGAATAGCA			
14	TCACCATCCATAACAGATTCAA	231	S	50
	TGAACGTAGCCAAATCCGTA			
15	TGACTGCGTACCTAACTTCAAAA	264	S	50
	CCCAGCAAAAATTTAAATCAA			
26	AACTGCTCAAAACGACTCCG	225	S	60
	CGAATTCAGGCTTAATGGGA			
27	ATTTTCGCCCTGTTGAC	124	S	47
	TCGAAAACCAAAATCAAAC			
28	ACCTAATCCCAATTCIA	130	S	47
	CATGGTTTAAATTAGTTTGG			
29	CAATTGATAAATGCCGATAAAAGA	114	N	50
	CCCTGATCGCGAATTCAGTA			
30	TGATTATTCATTTGGCAGTT	57	S	55
	CCTAATAGCGAAAATAAAT			
31	AGTTCAATTGATCCCACCCA	108	S	60
	ATTCTTCTCATCGACCAGCG			
32	GACTGCGTACCTAATCCCA	176	S	60
	TGACTGCGTACCTAATAGCGAA			
35	TGATTGACTGCGTACCTAATACA	266	S	55
	TCGATTGACTGCGGTACCTA			
38	ACGAGATGATATTTGAGC	175	N	50
	CGAATAATTCGATTGACT			
42	GACTGCGTACCTAATCCCA	176	S	60
	TGACTGCGTACCTAATAGCGAA			
45	GCACAAATGCGCACAACAT	294	N	50
	TTCAGAGCTCGAAAATAGTCCA			
46	TGTGAAAATTTGTCGGTGT	152	S	55
	TCGTAGACTGCGTACCTAATGC			

## 5.4 Discusión

Los fitoplasmas precisan la presencia de células huésped para ser cultivados. Al no poder ser aislados, es necesario, para su estudio genómico, el desarrollo de técnicas que permitan separar el ADN del fitoplasma del de la planta o insecto infectado. La caracterización del genoma de los fitoplasmas es fundamental para poder identificar qué factores intervienen en las relaciones específicas entre fitoplasmas y planta o insecto huésped, así como los mecanismos de movilidad dentro de la planta, virulencia, etc. En recientes trabajos, ya se han identificado fitoplasmas no patogénicos o mutados que inducen una sintomatología atenuada en la planta (Kison & Seemüller, 2001; Nishigawa *et al.*, 2002) y de cuyo estudio se espera empezar a entender estas relaciones. Sin embargo, hasta el momento el estudio del genoma de los fitoplasmas se encuentra limitado, debido principalmente a la dificultad para aislar su ADN.

Se han desarrollado diversas técnicas para separar el ADN del fitoplasma del de la planta huésped o vector. La primera metodología que se aplicó fue la centrifugación diferencial a partir de insectos infectados con fitoplasma, en combinación con la filtración, absorción cruzada con anticuerpos específicos para el vector y la centrifugación por gradiente del ADN en CsCl y bromuro de etidio (Kirkpatrick *et al.*, 1987). Se obtuvieron 24 colonias transformadas con ADN de fitoplasma de un total de 600 clones. Sin embargo para su aplicación era necesario conocer el vector que transmitía la enfermedad y la producción de un antisuero específico del insecto sano, factores que limitaron su uso. Más adelante, aprovechando el diferente contenido en A/T que hay entre mollicutes y plantas, dos grupos utilizaron la centrifugación en gradiente de CsCl y bisbenzimidida, para separar el ADN del fitoplasma del de la planta (Sears *et al.*, 1989; Kollar *et al.*, 1990). Kollar y sus colaboradores obtuvieron un total de 19 clones recombinantes con secuencias de fitoplasma, y Sears y su grupo 40, de los cuales 13 clones eran de fitoplasma. Esta metodología suponía realizar 2 ó 3 centrifugaciones y una gran cantidad de material vegetal de partida. En 1995, se utilizó la técnica de RAPDs (Chen & Chen, 1995) con un 60% de rendimiento, debido a la complejidad del ADN de la planta huésped (Arnaud *et al.*, 2002). Finalmente, Liefting & Kirkpatrick, (2002) han creado una librería de cósmidos mediante electroforesis en campo pulsante, resultando efectiva para la purificación diferentes genes, pero técnicamente muy

compleja. En nuestro trabajo se presenta una estrategia que combina el uso de algunas técnicas ya descritas con otras nuevas, que llevan a una fácil clonación de ADN del fitoplasma.

Tras una primera centrifugación del ADN de vinca infectada en gradiente de CsCl-bisbenzimidida, se obtuvieron dos bandas, una de las cuales, de baja densidad, estaba enriquecida con ADN de fitoplasma (20%). No obstante, para conseguir una mayor proporción de ADN de fitoplasma y asegurar el éxito en la clonación, fue necesaria la aplicación de otras técnicas que se describen a continuación.

Mediante la digestión del ADN de la fracción enriquecida con la enzima de restricción *AseI* y una posterior amplificación usando adaptadores y un cebador específico, se obtuvieron diferentes fragmentos de ADN que fueron clonados por transformación. Las longitudes de estos fragmentos oscilaron entre 150 y 600 pb. Estas longitudes, fueron un poco más pequeñas de lo estipulado en el modelo teórico de *M. pulmonis*, posiblemente debido a las variaciones existentes en las secuencias de ambos genomas.

La identificación de fragmentos de ADN del fitoplasma mediante hibridación directa, a partir de clones escogidos aleatoriamente fracasó, ya que se obtuvieron las mismas señales de hibridación utilizando las sondas de ADN de vinca sana e infectada. Se han obtenido resultados similares en otros trabajos (Davis *et al.*, 1988; Arnaud *et al.*, 2002) y se ha sugerido que podría deberse a la elevada complejidad del ADN utilizado como sonda (Arnaud *et al.*, 2002).

Por hibridación inversa se obtuvo que un 90 % de los clones (42 de 47) hibridaban con ADN de vinca infectada con fitoplasma de PD y no con vinca sana. Este porcentaje, es hasta ahora el mayor obtenido respecto a otros estudios (Kirkpatrick *et al.*, 1987; Sears *et al.*, 1989; Kollar *et al.*, 1990; Chen & Chen, 1995). Mediante la secuenciación y la posterior amplificación con los cebadores diseñados para algunas de estas secuencias, fueron corroborados los resultados anteriores y se observó que dos de los cinco clones considerados por hibridación como portadores de fragmentos de ADN de vinca, presentaban homología con secuencias de bacteria o fitoplasma, y un tercero amplificó específicamente para fitoplasma. Por lo tanto, este porcentaje podría estar subestimado. Contrariamente, la secuenciación de un clon considerado por hibridación como portador de ADN fitoplasmático, presentó homología con el ADN de planta. Estos falsos positivos o

negativos podrían ser debidos a una hibridación cruzada con ADN de otros microorganismos invasores de la planta, o a la similitud con determinadas secuencias de plantas, por lo que es posible que en algunos casos se hayan descartado clones que contenían fragmentos fitoplasmáticos y al revés. Por último, 3 clones considerados como portadores de ADN de fitoplasma, dieron amplificación positiva con ADN de vinca, por lo que deberían diseñarse nuevos cebadores para comprobar el origen de estos fragmentos.

Tras la secuenciación se calculó el contenido medio en A/T de los fragmentos (72.5%), que confirmó el origen fitoplasmático de los fragmentos clonados (Kollar *et al.*, 1989). Algunas de las secuencias (37) han sido depositadas en la base de datos pública, con los números de acceso de AJ583762 a AJ583797. Dieciséis de los clones secuenciados presentaron similitudes con secuencias de fitoplasmas u otras bacterias publicadas en la base de datos NCBI. Estas similitudes han permitido atribuir a los fragmentos obtenidos posibles funciones como las de replicación (DNA pol. III), formación de estructuras ribosómicas y biogénesis (las proteínas ribosomales L4 y L13, la subunidad beta de RNA polimerasa) translación (prolyl-tRNA sintetasa, el factor de transcripción eRF), reparación (endonucleasa IV), transporte (transportador ABC, Cobre-ATPasa, Calcio-ATPasa) y ADN de transferencia (Dot G) entre otras. Muchas de estas secuencias, no presentaron similitud con secuencias de otros fitoplasmas debido, probablemente, al número reducido de secuencias de fitoplasmas disponibles. Sin embargo, tampoco hemos encontrado similitud entre nuestras secuencias y la de otros fitoplasmas que codifican para las mismas proteínas, lo que apunta hacia una elevada variabilidad (o baja conservación) de las secuencias de fitoplasmas que codifican para estas proteínas. Esta observación coincide con los trabajos de Berg *et al.*, (1999) y Blomquist *et al.*, (2001) que hallaron porcentajes de similitud bajos al comparar las secuencias de una proteína de membrana, posiblemente implicada en la interacción planta- patógeno, en diferentes fitoplasmas, Por último, en 25 de los fragmentos secuenciados no se encontró similitud significativa con las secuencias disponibles en NCBI. Estos fragmentos, probablemente no presentaron homología, debido a su corta longitud (menores de 250 bp en la mayoría de los casos). En cambio, se han encontrado regiones de homología entre algunos de estos fragmentos (60-70pb), sugiriendo la presencia de secuencias repetidas o redundancias en el genoma, tal como ha sido mencionado en trabajos

anteriores con fitoplasmas y micoplasmas (Bhurgra & Dybvig, 1993; Chen & Chen, 1995; Himmelreich *et al.*, 1997; Marzachi *et al.*, 2000).

La técnica presentada en este trabajo, permite la comparación de genomas fitoplasmáticos a gran escala. En la actualidad la comparación de fitoplasmas a nivel molecular está basada en (i) comparación de secuencias o análisis por RFLP de uno o varios genes amplificados por PCR (Schneider *et al.*, 1997; Wongkaew *et al.*, 1997, Seemüller *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1998b, Davis & Dally, 2001) o (ii) análisis del ADN total por Southern blot o dot.blot (Bertaccini *et al.*, 1990, Lee *et al.*, 1992; Saillard *et al.*, 1993). Ninguno de estos métodos permite hacer un amplio estudio comparativo. En cambio, con el análisis de unos 500 clones obtenidos según el procedimiento expuesto en este capítulo, se podría secuenciar un 10% del genoma del fitoplasma. Los datos presentes hasta el momento apuntan hacia la existencia de diferencias entre aislados de un mismo tipo (Jaraush *et al.*, 2000; Kison & Seemüller, 2001; Berges & Seemüller, 2002). Con el 10% del genoma disponible sería posible estudiar si existen diferencias entre fitoplasmas de diferentes grupos, del mismo grupo e incluso dentro de una población natural de un fitoplasma determinado.

## 5.5 Bibliografía

- Altschul, Stephen F., Warren Gish, Webb Miller, Eugene W. Myers, and David J. Lipman (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403-10.
- Arnaud, G., Fassi, L.F., Verdin, E., Blanchard, A., Foissac, X., Garnier, M., 2002. Cloning of stolbur phytoplasma genes by Supression Subtractive Hybridization (SSH). 14<sup>th</sup> International congress of the International Organization for Mycoplasmaology (IOM). July 7-12. Viena, Austria.
- Berg, M., Davies, D. L., Clark, M. F., Vetten, H. J., Maier, G., Marcone, C., Seemüller, E., 1999. Isolation of the gene encoding an immunodominant membrane protein of the apple proliferation phytoplasma, and expression and characterization of the gene product. *Microbiology* 145, 1937-1943.
- Berges, R., Seemüller, E., 2002. Impact of phytoplasma infection of common alder (*Alnus glutinosa*) depends on strain virulence. *For. Path.* 32, 357-363.

- Bertaccini, A., Davis, R.E., Lee, I.M., Conti, M., Dally, E.L., Douglas, S.M., 1990. Detection of chrysanthemum yellows mycoplasma-like organism by Dot hybridisation and Southern blot analysis. *Plant Dis.* 74, 40-43.
- Bhurgra, B., and K. Dybvig. Identification and characterization of IS1138, a transposable element from *Mycoplasma pulmonis* that belongs to the IS3 family. 1993. *Mol. Microbiol.* 7:577-584.
- Blomquist, C.L., Barbara, D.J., Davies, D.L., Clark, M.F., Kirkpatrick, B.C., 2001. An immunodominant membrane protein gene from the western X-disease phytoplasma is distinct from those of other phytoplasmas. *Microbiology* 147, 571-580.
- Blomquist, C.L., Kirkpatrick, B.C., 2002. Frequency and seasonal distribution of pear psylla infected with the pear decline phytoplasma in California pear orchards. *Phytopathology* 92, 1218-1226.
- Boudon-Padiou, E., Larrue, J., Caudwell, A., 1989. ELISA and Dot-blot detection of Flavescence dorée-MLO in individual leafhopper vectors during latency and inoculative state. *Curr. Microbiol.* 19, 357-364.
- Chen, K.H., Chen, T.A., 1995. A novel method for cloning DNA of plant-pathogenic mycoplasma-like organisms. *Can. J. Microbiol.* 41, 753-757.
- Chen, J., Chang, C.J., Jarret, R.L., 1992. DNA probes as molecular markers to monitor the seasonal occurrence of walnut witches' broom mycoplasma-like organism. *Plant Dis.* 76, 1116-1119.
- Chuang, J.G., Lin, C.P., 2000. Cloning of *gyrB* and *gyrA* genes of phytoplasma associated with peanut witches' broom. *Plant Pathol. Bull.* 9, 157-166.
- Cousin, M., 1995. Phytoplasmas and phytoplasma diseases. *Agronomie.* 15, 245-264.
- Davis, M.J., Tsai, J.H., Cox, R.L., McDaniel, L.L., Harrison, N.A., 1988. Cloning of chromosomal and extrachromosomal DNA of the mycoplasma-like organism that causes maize bushy stunt disease. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 1, 295-302.
- Davis, R.E., Dally, E.L., 2001. Revised subgroup classification of group 16SrV phytoplasmas and placement of flavescence dorée-associated phytoplasmas in two distinct subgroups. *Plant Dis.* 85, 790-797.
- Davis, R.E., Dally, E.L., Bertaccini, A., Lee, I-M., Credi, R., Osler, R., Savino, V., Carraro, L., Di Terlizzi, B., Barba, M., 1993. Restriction fragment length polymorphism analyses and dot hybridisations distinguish mycoplasma-like organisms associated with Flavescence dorée and southern European grapevine yellows disease in Italy. *Phytopathology* 83, 772-776.
- Deng, S., Hiruki, C., 1991. Genetic relatedness between two nonculturable mycoplasma-like organisms revealed by nucleic acid hybridisation and polymerase chain reaction. *Phytopathology* 81, 1475-1479.

- Doyle, J.J., Doyle, J.L., 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*. 12, 262-269.
- Himmelreich, R., H. Plagens, Hilbert, H., B. Reiner and Hermann R. Comparative analysis of the genomes of the bacteria *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma genitalium*. *Nucleic Acids Res.* 1997. 25: 701-712.
- Jaraus, W., Saillard, C., Heliot, B., Garnier, M., Dosba, F., 2000. Genetic variability of apple proliferation phytoplasmas as determined by PCR-RFLP and sequencing of a nonribosomal fragment. *Mol. Cell. Probes* 14, 17-24
- Kakizawa, S., Oshima, K., Kuboyama, T., Nishigawa, H., Jung Hee Young., Sawayanagi, T., Tsuchizaki, T., Miyata, S., Ugaki, M., Namba, S., 2001. Cloning and expression analysis of phytoplasma protein translocation genes. *Mol. Plant- Microbe Interact.* 14 (9), 1043-1050.
- Kinzler K.W., Vogelstein, B., 1989. Whole genome PCR: application to the identification of sequences bound by gene regulatory proteins. *Nucleic Acids Res.* 17, 3645-3653.
- Kirkpatrick, B.C., Stenger, D.C., Morris, T.J., Purcell, A.H., 1987. Cloning and detection of DNA from a nonculturable plant pathogenic mycoplasma-like organism. *Science* 238, 197-199.
- Kison, H., Seemüller, E., 2001. Differences in strain virulence of the European stone fruit yellows phytoplasma and susceptibility of stone fruit trees on various rootstocks to this pathogen. *J. Phytopathol.* 149, 533-541.
- Kollar, A., Seemüller, E., 1989. Base composition of the DNA of mycoplasma-like organisms associated with various plant diseases. *J. Phytopathol.* 127, 177-186.
- Kollar, A., Seemüller, E., Bonnet, F., Saillard, C., Bové, J.M., 1990. Isolation of the DNA of various plant pathogenic mycoplasma-like organisms from infected plants. *Phytopathology* 80, 233-237.
- Kuan, C.P., Su, H.J., 1998. Development of cloned probes for phytoplasma associated with Loofah witches' broom. *J. Phytopathol.* 146, 309-313.
- Kuske, C.R., Kirkpatrick, B.C., Seemüller, E., 1991. Differentiation of virescence phytoplasmas using western aster yellows mycoplasma-like organism chromosomal DNA probes and restriction fragment length polymorphism analysis. *J. Gen. Microbiol.* 137, 153-159.
- Lee, I-M., Davis, R.E., Chen, T.A., Chiykowski, L.N., Fletcher, J., Hiruki, C., Schaff, D.A., 1992. A genotype-based system for identification and classification of mycoplasma-like organisms (MLOs) in the aster yellows MLO strain cluster. *Phytopathology* 82, 977-986.
- Lee, I-M., Gundersen-Rindal, D.E., Davis, R.E., Bartoszyk, I.M., 1998. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48, 1153-1169.

- Liefting L.W., Kirkpatrick B.C., 2003. Cosmid cloning and sample sequencing of the genome of the uncultivable mollicute, Western X-disease phytoplasma, using DNA purified by pulsed-field gel electrophoresis. *FEMS Microbiol. Lett.* 221 (2), 203-211.
- Marzachi, C., Veratti, F., d'Aquilio, M., Vischi, A., Conti, M., Boccardo, G., 2000. Molecular hybridization and PCR amplification of non-ribosomal DNA to detect and differentiate stolbur phytoplasma isolates from Italy. *J. Plant Pathol.* 82 (3), 201-212.
- Mergenthaler, E., Viczian, O., Fodor, M., Sule, S., 2001. Isolation and expression of an immunodominant membrane protein gene of the ESFY phytoplasma for antiserum production. *Acta Hort.* 550, 355-360.
- Morton, A., Davies, D.L., Blomquist, C.L., Barbara, D.J., 2003. Characterization of homologues of the apple proliferation immunodominant membrane protein gene from three related phytoplasmas. *Mol. Plant Pathol.* 4, 109-114.
- Nishigawa, H., Oshima, K., Kakizawa, S., Jung HeeYoung, Kuboyama, T., Miyata, S., Ugaki, M., Namba, S., 2002. A plasmid from a non-insect-transmissible line of a phytoplasma lacks two open reading frames that exist in the plasmid from the wild-type line. *Gene* 298, 195-201.
- Palmano, S., 2001. A comparison of different phytoplasma DNA extraction methods using competitive PCR. *Phytopathol. Medit.* 40, 99-107.
- Pressaco, L., Firrao, G., 1999. A General polymerase chain reaction assay for the quantification of phytoplasmas. First internet conference on phytopathogenic mollicutes. <http://www.uniud.it/phytoplasma/conf.html>.
- Saillard, C., Bonnet, F., Bouneau, L., Dosba, F., Seemüller, E., Bové, J.M., 1993. DNA probes for detection of apple proliferation and chlorotic leaf roll MLOs. *Phytopathol. Medit.* 32, 80.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 74, 5463-7.
- Schneider, B., Gibb, K.S., Seemüller, E., 1997. Sequence and RFLP analysis of the elongation factor Tu gene used in differentiation and classification of phytoplasmas. *Microbiology* 143, 3381-3389.
- Sears, B.B., Lim, P., Holland, N., Kirkpatrick, B.C., Klomparens, K. L., 1989. Isolation and characterization of DNA from mycoplasma-like organism. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 2, 175-180.
- Seemüller, E., Marcone, C., Lauer, U., Ragozzino, A., Göschl, M., 1998. Current status of molecular classification of the phytoplasmas. *J. Plant Pathol.* 80, 3-26.

Wongkaew, P., Hanboonsong, Y., Sirithorn, P., Choosai, C., Boonkrong, S., 1997. Differentiation of phytoplasmas associated with sugarcane and gramineous weed white leaf disease and sugarcane grassy shoot disease by RFLP and sequencing. *Theor. Appl. Genet.* 95, 660-663.

# 6

## **Evaluación de la especificidad de algunos de los fragmentos de ADN clonados del fitoplasma del Decaimiento del peral, mediante dot.blot y PCR.**

### **Resumen**

La técnica de hibridación por dot.blot ha sido utilizada para detectar el fitoplasma del Decaimiento del peral (PD) con secuencias de ADN no ribosómicas. Para este propósito, se escogieron los fragmentos insertados en los clones 7 y 14, del capítulo anterior. Ambos fragmentos fueron marcados con digoxigenina y empleados como sondas, para hibridar con extractos de ADN de perales y psilas infectados con este microorganismo. El fitoplasma de PD se detectó en ambos extractos.

Se han realizado también ensayos para evaluar la sensibilidad de estas sondas en la detección del fitoplasma de PD. Para ello, se analizaron extractos de ADN de psilas, por nested-PCR e hibridación por dot.blot. Los resultados obtenidos fueron similares con ambas técnicas. Por ello, se propone la hibridación ADN / ADN como una alternativa a la PCR, y como una técnica rápida y sencilla para utilizar en estudios epidemiológicos, donde deben analizarse un gran número de muestras.

Por último, el ADN de diferentes fitoplasmas, se ha utilizado para determinar si los cebadores diseñados para estos dos fragmentos eran específicos para el fitoplasma de PD, o amplificaban secuencias de otros fitoplasmas. Al obtenerse una banda específica con ADN del fitoplasma de la Proliferación del manzano (AP) y con el del PD, se confirma la relación filogenética existente entre ambos. No se obtuvo amplificación para los restantes fitoplasmas utilizados.

Palabras clave: nested-PCR, hibridación por dot.blot, sondas no- ribosómicas, cebadores.

Presentado en: *19th International symposium on virus and virus-like diseases of temperate fruit. 10<sup>th</sup> International symposium on small fruit virus diseases. Proximamente publicado en Acta Horticulturae (en prensa)*

## 6.1 Introducción

Para la detección e identificación de diversos patógenos como virus, hongos y bacterias, se están utilizando diversas técnicas, entre ellas, la PCR (Makimura *et al.*, 1994; Thomson & Dieztgen, 1995). Con los fitoplasmas, ante la imposibilidad de aislar su genoma, también se ha empleado esta metodología. Se han desarrollado cebadores universales capaces de identificar todos los fitoplasmas (Lee *et al.*, 1993; Kirkpatrick *et al.*, 1994; Lorenz *et al.*, 1995), como cebadores específicos para determinados fitoplasmas con una única amplificación (Jarausch *et al.*, 1994; Smart *et al.*, 1996; Bertaccini & Martini, 1998; Jarausch *et al.*, 2000). Actualmente existen algunos cebadores ribosómicos y no ribosómicos específicos para el grupo AP o el fitoplasma del Decaimiento del peral (PD) (Jarausch *et al.*, 1994; Lorenz *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1995). Pero debido a la poca concentración en la que se encuentran los fitoplasmas en la planta (Marzachi *et al.*, 1999; Waterworth & Mock, 1999; Heinrich *et al.*, 2001), suele utilizarse la nested-PCR (Marccone *et al.*, 1996; Bertaccini *et al.*, 1997; Lee & Ko, 1998). Sin embargo, esta práctica comporta el riesgo de que aparezcan falsos positivos por contaminación cruzada, por lo que deben buscarse alternativas. La nested-PCR en un solo tubo, que ya se aplica con otros microorganismos (Bertolini *et al.*, 2000), se está perfeccionando para su uso en fitoplasmas, lo que podría ser una buena solución (Batlle, comunicación personal).

Por otra parte, se han obtenido sondas de ADN cromosómico y extra cromosómico de diferentes fitoplasmas, útiles para la detección de estos microorganismos y para estudios filogenéticos. Existen estudios en los que se ha trabajado con sondas radioactivas para la detección del fitoplasma del PD (Guerra, 1997; Blomquist & Kirkpatrick, 2002).

Uno de los objetivos de este capítulo, ha sido buscar una metodología sencilla y sensible, capaz de detectar el fitoplasma de PD en plantas e insectos. Para ello, se ha estudiado la posibilidad de utilizar los fragmentos de los clones 7 y 14 del capítulo anterior, como sondas no radioactivas, en hibridación por dot.blot. Se han examinado las condiciones óptimas para detectar por hibridación el fitoplasma de PD. Paralelamente, ha sido evaluada la fiabilidad de estos fragmentos, para detectar este microorganismo, por comparación con la técnica de nested-PCR.

Por último, se han examinado cuales eran las condiciones óptimas de amplificación, con los cebadores diseñados en el capítulo anterior, a partir de los fragmentos 7 y 14, para detectar el fitoplasma de PD por PCR. Ha sido estudiada también la especificidad de estos

cebadores, analizando si reconocen otros fitoplasmas incluidos dentro del grupo AP, al que pertenece PD, u otros grupos de fitoplasmas.

## 6.2 Material y Métodos

### 6.2.1 Puesta a punto de la detección por hibridación de ácidos nucleicos o dot.blot, con dos sondas no ribosómicas, obtenidas a partir de los fragmentos 7 y 14 del genoma de PD

#### 6.2.1.1 Material

En este estudio se utilizaron muestras, sanas e infectadas con el fitoplasma de PD, de vinca (*Catharanthus roseus*), peral (*Pyrus sp.*) y *Cacopsylla pyri*.

#### 6.2.2.2 Extracción de ácidos nucleicos

Para la extracción de ácidos nucleicos a partir de vinca, se siguió el método de Doyle & Doyle (1990), el de Ahrens & Seemüller (1992) para peral, y el de Daire *et al.*, (1992) para *C. pyri*.

#### 6.2.2.3 Detección del fitoplasma de PD: Preparación de las sondas e hibridación por dot.blot

A partir de las colonias 7 y 14 (apartado 5.3.5, tabla 5.1), se realizó una PCR con los cebadores M13f/r, tal como se indica en el apartado 5.2.7. Durante la amplificación, los fragmentos de ADN fueron marcados no radiactivamente con digoxigenina (Digoxigenina 11 dUTP alkal-stabile, Roche), para ser utilizados posteriormente como sondas de hibridación.

Se probaron diferentes condiciones de pre-hibridación e hibridación. En cada ensayo se desnaturalizaron y fijaron en membrana de nylon, entre 30 y 100 ng de ADN del material infectado (vinca, peral o psila). La pre-hibridación e hibridación se realizaron en las

mismas condiciones que en el apartado 5.2.8.1, utilizándose diferentes temperaturas y porcentajes de formamida desionizada (25 o 50%).

### **6.2.2 Comparación de la sensibilidad de las técnicas de nested-PCR y dot.blot en la detección del fitoplasma de PD, en *C. pyri*.**

Se compararon 2 técnicas, para detectar el fitoplasma de PD en *C. pyri*, la nested-PCR y el dot.blot. Durante el invierno de 2002 (Diciembre) y en primavera de 2003 (Abril), fueron capturadas 30 y 15 psilas respectivamente de la parcela de peral cv. Williams, afectada por el fitoplasma de PD, y mencionada en el apartado 4.2.1. Los extractos de ADN de los insectos, obtenidos según la metodología de Daire *et al.*, (1992), fueron analizados por ambos procedimientos. La nested-PCR se realizó con los cebadores universales P1/P7 (Deng & Hiruki, 1991; Schneider *et al.*, 1995) y los específicos fO1/rO1 (Lorenz *et al.*, 1995) según la metodología explicada en el apartado 2.2.2.1 y la hibridación, con la sonda 14, en las condiciones óptimas obtenidas en el apartado anterior.

### **6.2.3 Detección del fitoplasma de PD por PCR, con cebadores no ribosómicos, y análisis de su especificidad.**

#### 6.2.3.1 Material vegetal

Se estudió si los cebadores diseñados para los fragmentos 7 y 14, del apartado 5.3.6, tabla 5.2, identificaban de forma específica el fitoplasma de PD, o si podían amplificar también para secuencias homólogas de otros fitoplasmas. Se utilizaron muestras de ADN de vinca sana, y de vincas infectadas con diferentes fitoplasmas: PD (16Sr X-C), ACLR (16 Sr I-F), GSFY-1 (16SrX-B), ULW (16Sr V-A), FBP (16Sr II-C), GVX (16Sr III-A), PYLR (16Sr III-A), AY (16Sr I-B) y AP (16Sr X-A). Los extractos de ADN fueron cedidos por la doctora Asunta Bertaccini (Patologia vegetale, Università degli Studi, Bologna).

### 6.2.3.2 Detección de fitoplasmas

En primer lugar, se ensayaron diferentes condiciones de amplificación para ambos pares de cebadores, utilizando extractos de ADN de vinca sana y de vinca infectada con el fitoplasma de PD. Con cada par de cebadores se realizó una PCR de gradiente, con temperaturas de anillamiento de entre 50°C y 60°C y diferentes concentraciones de Cl<sub>2</sub>Mg.

En un volumen total de 50 µl, se añadieron 50-100 ng de ADN, 0,4 µM de cada uno de los cebadores, 400 µM de dNTPs, 5 µl de LAB10X (15 mM Cl<sub>2</sub>Mg; 100 mM Tris-HCl (pH 9); 500 mM KCl; 1,1% de gelatina), y 0,5 µl de Taq polimerasa (6U/ µl). La amplificación se realizó en un termociclador Techne (Genius) con una desnaturalización inicial de 2 min a 95°C, seguido de 40 ciclos de 20 seg a 94°C; 20 seg a la temperatura de anillamiento, y 30seg a 72°C. La extensión final fue de 10 min a 72°C.

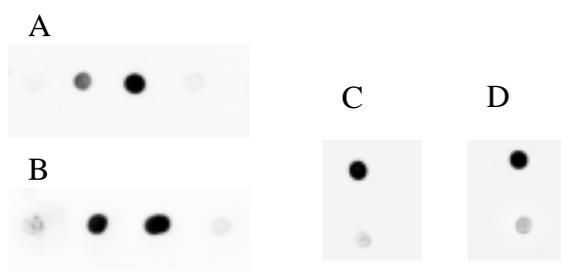
El producto de amplificación de la PCR se analizó mediante electroforesis en un gel de agarosa D-1 (Pronadisa, Madrid, España) al 2 %, con un tampón estándar TAE 1X (Sambrook *et al.*, 1989). El ADN fue teñido con bromuro de etidio y visualizado mediante luz ultravioleta.

Las mejores condiciones de amplificación para el fitoplasma de PD, se utilizaron para un posterior análisis de especificidad de los cebadores diseñados, con diferentes extractos de ADN de fitoplasmas.

## 6.3 Resultados

### 6.3.1 Puesta a punto de la detección por hibridación de ácidos nucleicos o dot.blot, con dos sondas no ribosómicas, obtenidas a partir de los fragmentos 7 y 14 del genoma del PD

Las condiciones óptimas de hibridación fueron a 60°C de temperatura y con 50% de formamida desionizada. Se obtuvo una señal de marcaje fuerte con ADN de vinca, perales e insectos infectados, y un bajo ruido de fondo con vinca sana, *Cacopsylla pyri* y perales sanos (Figura 6.1).



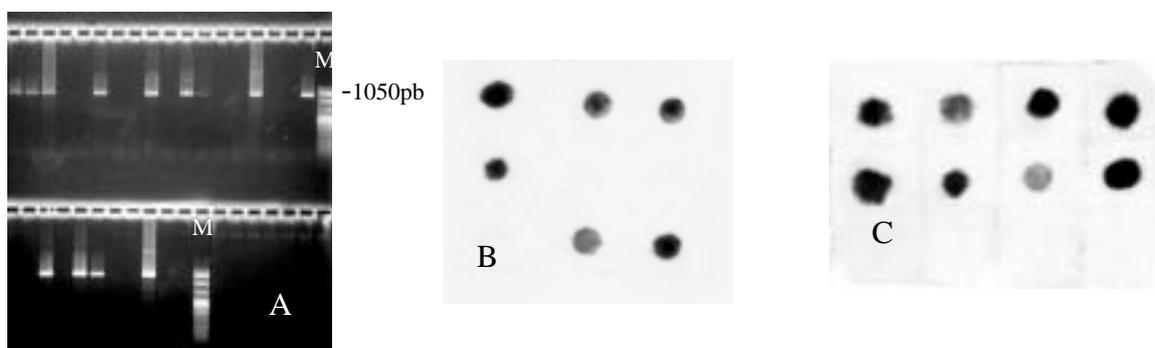
**Figura 6.1-** Hibridación por dot.blot utilizando las sondas, marcadas con digoxigenina, 14 (A, C) y 7 (B, D), a 60°C de temperatura y 50% de formamida desionizada. En las membranas A y B se utilizaron muestras de ácidos nucleicos de: peral sano, peral infectado con el fitoplasma de PD, insecto infectado e insecto sano respectivamente. En las membranas C y D: muestras de ácidos nucleicos de vinca infectada (arriba) y vinca sana (abajo).

### 6.3.2 Comparación de la sensibilidad de las técnicas de nested- PCR y dot.blot en la detección del fitoplasma de PD en *C. pyri*.

En la Tabla 6.1 se presentan los resultados obtenidos de la detección del fitoplasma de PD en psilas mediante dot.blot y nested-PCR. En Diciembre, mediante hibridación por dot.blot y con la sonda del fragmento 14, se detectaron 21 insectos infectados. En cambio, por nested-PCR se detectaron 19 insectos. Fueron necesarias 2 rondas de amplificación más para detectar los dos falsos negativos. En primavera, fueron detectadas 10 psilas infectadas, tanto por hibridación como por PCR (Tabla 6.1 y Figura 6.2).

**Tabla 6.1-** Detección del fitoplasma de PD en psilas utilizando las técnicas de dot.blot y Nested-PCR. Las psilas fueron capturadas en invierno (Diciembre) y primavera (Abril).

Método de detección	Mes de captura de las psilas	
	Diciembre 2002	Abril 2003
	N° de psilas infectadas/ N° total de psilas capturadas	
nested-PCR	19/30*	10/15
dot.blot	21/30	10/15

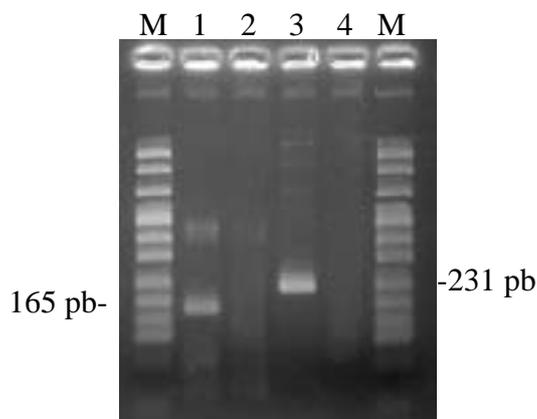


\* En Diciembre se repitió la nested-PCR tres veces para evitar falsos negativos.

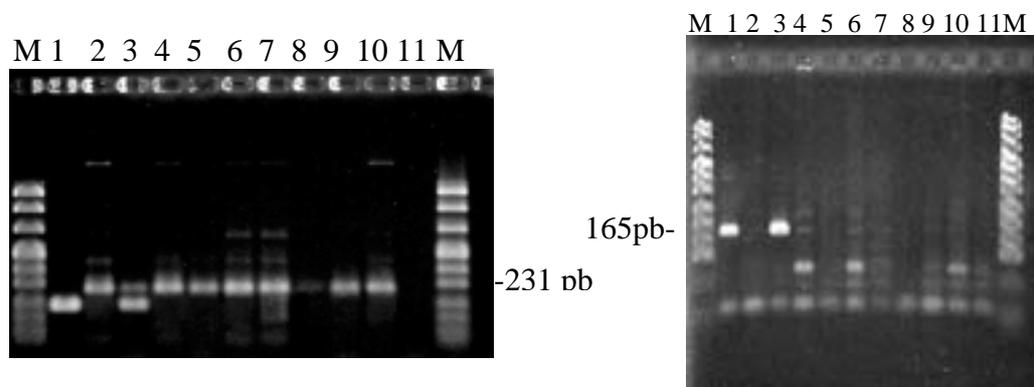
**Figura 6.2- A:** Identificación del fitoplasma de PD en psilas capturadas durante Diciembre de 2002 y Abril de 2003. La detección se realizó mediante nested-PCR con los cebadores universales P1/P7 y los específicos fO1/rO1. M: Marcador pUC Mix,8. **B y C:** Identificación del fitoplasma de PD en psilas capturadas durante Diciembre de 2002 (B) y Abril de 2003 (C) mediante hibridación por dot.blot.

### 6.3.3 Detección del fitoplasma de PD por PCR con cebadores no ribosómicos, y análisis de su especificidad.

Las mejores condiciones de amplificación para el fitoplasma de PD con ambos pares de cebadores fueron una temperatura de anillamiento de 55°C, y 3,5 mM de Cl<sub>2</sub>Mg (Figura 6.3). En las Figuras 6.4a y 6.4b se presentan los resultados de la amplificación, mediante PCR, con los cebadores de los fragmentos 7 y 14 y para diferentes extractos de ADN. Con ambos pares de cebadores se obtuvo una amplificación positiva para los fitoplasmas de PD y AP, pero no con ADN de vinca sana ni con el resto de fitoplasmas.



**Figura 6.3-** Amplificación por PCR, mediante los cebadores 7f/r (carriles 1 y 2) y 14f/r (carriles 3 y 4), con ADN de vinca infectada (carriles 1 y 3) y sana (carriles 2 y 4) a 55°C de temperatura de anillamiento y 3,5mM de Cl<sub>2</sub>Mg. M: Marcador pUC Mix, 8.



**Figura 6.4-** Amplificación por PCR, con los cebadores 7f/r (a) y 14f/r (b), con extractos de ADN de vinca infectada con los fitoplasmas: PD (1), ACLR (2), AP15 (3), GSFY (4), PYLR (5), FBP (6), AY219 (7), GVX (8), ULW (9), vinca sana (10), H<sub>2</sub>O destilada (11).M: Marcador pUC Mix, 8

## 6.4 Discusión

Las sondas obtenidas a partir de los clones 7 y 14, fueron capaces de detectar el fitoplasma de PD en vinca, psila y peral infectados. Se consiguió una fuerte hibridación con muestras infectadas, y ninguna o un suave marcaje con los controles negativos, esto último, posiblemente debido a una parcial homología con secuencias del genoma de la planta u otros microorganismos presentes.

El número de psilas infectadas que se detectaron por nested-PCR y dot.blot fueron similares salvo en alguna excepción. En invierno y mediante dot.blot, se identificaron 2 psilas más como portadoras del fitoplasma. Para detectar estos dos falsos negativos, fue necesario repetir la PCR. Las psilas, durante la diapausa y debido a la acumulación de reservas (Nechols *et al.*, 1999), contienen sustancias que pueden interferir en la reacción de amplificación. En cambio, estas sustancias posiblemente no afectaron a la hibridación por dot.blot. En primavera, la psila con morfotipo de verano empieza a adquirir el fitoplasma, y por tanto es posible que en la mayoría de los insectos, la concentración del fitoplasma sea más baja. En estas condiciones, se obtuvieron el mismo número de psilas portadoras de fitoplasma, con ambas metodologías.

Los resultados muestran que ambas técnicas son útiles para detectar el fitoplasma de PD. Sin embargo, la nested-PCR presenta una serie de desventajas, como la aparición de

falsos positivos por contaminación cruzada en la segunda amplificación, o la interferencia en la amplificación, por la presencia de inhibidores (Lepka *et al.*, 1999; Nechols *et al.*, 1999; Musetti *et al.*, 2000). Además, la PCR directa con algunos cebadores universales, también amplifica, además de ADN fitoplasmático, ADN de otras bacterias (Skrzeczowski *et al.*, 2001). Por lo tanto, podría ser interesante utilizar estos dos fragmentos de ADN no-ribosómicos en hibridación por dot.blot, como alternativa a la PCR, para la detección del fitoplasma de PD.

En el análisis de especificidad de los dos pares de cebadores diseñados, que provienen de secuencias no ribosómicas (regiones menos conservadas que las ribosómicas) tan sólo amplificaron los extractos de ADN del fitoplasma de AP y del fitoplasma de PD. El hecho que no amplificasen con el ADN del fitoplasma ESFY, incluido dentro del grupo AP (Seemüller *et al.*, 1998), sugiere que posiblemente, AP y PD presenten en estos genes mayor homología.

Gracias a la comparación de secuencias, se han podido estudiar las relaciones filogenéticas existentes entre los fitoplasmas (Schneider *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1998; Seemüller *et al.*, 1998). En diversos fitoplasmas se ha caracterizado una proteína de membrana, que parece estar implicada en el reconocimiento específico de la planta o del vector huésped (Yu *et al.*, 1998; Berg *et al.*, 1999; Blomquist *et al.*, 2001; Mergenthaler *et al.*, 2001, Morton *et al.*, 2003). Morton y su equipo, compararon entre los fitoplasmas que integran el grupo AP (Seemüller *et al.*, 1998) las secuencias que codifican para esta proteína, confirmando la estrecha relación que existe entre estos: AP, PD, PYLR y ESFY (Morton *et al.*, 2003). Sin embargo, el hecho que en nuestro caso no haya sido amplificado el ADN de ESFY con ninguno de los dos pares de cebadores, indica que tal vez existe mayor homología entre los genomas de los fitoplasmas de AP y PD que con el de ESFY. Aunque la secuenciación del gen 16S rRNA revela que hay mayor similitud entre PD y AP (98,4) que entre PD y ESFY (98,1) (Morton *et al.*, 2003), deberían realizarse más pruebas con otros cebadores para evidenciarlo. Además, debería ser incluido el fitoplasma de PYLR en nuevos estudios, para comprobar si realmente este fitoplasma es también distinguible de PD, como sugiere el estudio de las proteínas de membrana (Morton *et al.*, 2003)

## 6.5 Bibliografía

- Ahrens, U., Seemüller, E., 1992. Detection of DNA of plant pathogenic Mycoplasma-like organisms by a Polymerase Chain Reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA Gene. *Phytopathol.* 82, 828-832.
- Berg, M., Davies, D. L., Clark, M. F., Vetten, H. J., Maier, G., Marcone, C., Seemüller, E., 1999. Isolation of the gene encoding an immunodominant membrane protein of the apple proliferation phytoplasma, and expression and characterization of the gene product. *Microbiology* 145, 1937-1943.
- Bertaccini, A., Martini, M., 1998. Ribosomal and non-ribosomal primers for sensitive detection and identification of phytoplasmas. *Petria* 9, 89-92.
- Bertaccini, A., Vibio, M., Pastore, M., Recupero, S., Guerrini, S., Grimaldi, D. 1997. Nested-PCR assays for detection of phytoplasmas in strawberry. *Acta Hort.* 439, 787-790
- Bertolini, E., Olmos, A., Gorris, M.T., Martinez, M.C., Lopez, M.M., Cambra, M., 2000. Detección simultánea de 4 virus y la bacteria *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* en olivo mediante multiplex-nested PCR en un solo tubo cerrado. X Congreso de la sociedad española de Fitopatología. Valencia.
- Blomquist, C.L., Barbara, D.J., Davies, D.L., Clark, M.F., Kirkpatrick, B.C., 2001. An immunodominant membrane protein gene from the western X-disease phytoplasma is distinct from those of other phytoplasmas. *Microbiology (reading)* 147 (3), 571-580.
- Blomquist, C.L. and Kirkpatrick, B.C. 2002. Frequency and seasonal distribution of pear psylla infected with the pear decline phytoplasma in California pear orchards. *Phytopathology* 92 (11), 1218-1226.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus.* 12, 262-269.
- Daire, X., Boudon-Padieu, E., Berville, A., Schneider, B., Caudwell, A., 1992. Cloned DNA probes for detection of Grapevine Flavescence Dorée Mycoplasma-like organism (MLO). *Ann. Appl. Biol.* 121, 95-103.
- Deng, S., Hiruki, C., 1991. Amplification of 16s rRNA genes from culturable and nonculturable mollicutes. *J. Microbiol. Meth.* 14, 53-61.
- Guerra, L.J., 1997. Biological and molecular characterization of phytoplasmas infecting fruit and nut trees in California. Ph.D. Thesis. University of California, Davis.
- Heinrich, M., Botti, S., Caprara, L., Arthofer, W., Strommer, S., Hanzer, V., Katinger, H., Bertaccini, A., Laimer da Câmara Machado, M., 2001. Improved detection methods for fruit tree phytoplasmas. *Plant Mol. Biol. Repr.* 19, 169-179.
- Jarausch, W., Saillard, C., Broquaire, J., Garnier, M., Dosba, F., 2000. PCR-RFLP and sequence analysis of a non-ribosomal fragment for genetic characterization of European stone fruit yellows phytoplasmas infecting various *Prunus* species. *Mol. Cellular Probes* 14, 171-179.

- Jarausch, W., Saillard, C., Dosba, F., Bové, J.M., 1994. Differentiation of mycoplasma-like organisms (MLOs) in European fruit trees by PCR using specific primers derived from sequence of a chromosomal fragment of the apple proliferation MLO. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 2916-2923.
- Kirkpatrick, B.C., Smart, C., Blomquist, C., Guerra, L., Harrison, N., Ahrens, U., Lorenz, K. H., Schneider, B., Seemüller, E., 1994. Identification of MLO-specific PCR primers obtained from 16S/23S rRNA spacer sequences. *Proceeding of the 10<sup>th</sup> International Congress of the International Organization for Mycoplasmaology (IOM).* 261-262.
- Lee, I.-M., Bertaccini, A., Vibio, M., Gundersen-Rindal, D.E., 1995. Detection of multiple phytoplasmas in perennial fruit trees with decline symptoms in Italy. *Phytopathology* 85, 728-735.
- Lee, I.-M., Gundersen-Rindal, D.E., Davis, R.E., Bartoszyk, I.M., 1998. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *Int. J. Sys. Bacteriol.* 48, 1153-1169.
- Lee, I.-M., Hammond, R.W., Davis, R.E., Gundersen-Rindal, D.E., 1993. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology* 83, 834-842.
- Lee, I.-M., Ko W.-H., 1998. Phytoplasmas are not associated with quick decline of macadamia trees in Hawaii. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 39, 251-254.
- Lepka, P., Stitt, M., Moll, E., Seemüller, E., 1999. Effect of phytoplasma infection on concentration and translocation of carbohydrates and amino acids in periwinkle and tobacco. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 55, 59-68.
- Lorenz, K.H., Schneider, B., Ahrens, U., Seemüller, E., 1995. Detection of the apple proliferation and pear decline phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and non-ribosomal DNA. *Phytopathol.* 85, 771-776.
- Makimura, K., Murayama, S.Y., Yamaguchi, H., 1994. Detection of a wide range of medically important fungi by PCR. *J. Med. Microbiol.* 40, 358-364.
- Marcone, C., Ragozzino, A., Seemüller, E., 1996. Association of phytoplasmas with the decline of European hazel in southern Italy. *Plant Pathol.* 45, 857-863.
- Marzachi, C., Alma, A., d'Aquilio, M., Minuto, G., Boccardo, G., 1999. Detection and identification of phytoplasmas infecting cultivated and wild plants in Liguria (Italian Riviera). *J. Plant Pathol.* 81 (2), 127-136.
- Mergenthaler, E., Viczian, O., Fodor, M., Sule, S., 2001. Isolation and expression of an immunodominant membrane protein gene of the ESFY phytoplasma for antiserum production. *Acta Hort.* 550 (2), 355-360.

- Morton, A., Davies, D.L., Blomquist, C.L., Barbara, D.J., 2003. Characterization of homologues of the apple proliferation immunodominant membrane protein gene from three related phytoplasmas. *Mol. Plant Pathol.* 4 (2),109-114.
- Musetti, R., Favali, M.A., Pressacco, L., 2000. Histopathology and polyphenol content in plants infected by phytoplasmas. *Cytobios* 102, 133-147.
- Nechols, J.R., Tauber, M.J., Tauber, C.A., Masaki, S., 1999. Adaptations to hazardous seasonal conditions: dormancy, migration, and polyphenism. In: *Ecological entomology*, Second Edition. C.M. Huffaker and A.P. Gutierrez, eds. John Wiley and sons, NY. 756 pp.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: a Laboratory 125 Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Schneider, B., Gibb, K.S., Seemüller, E., 1997. Sequence and RFLP analysis of the elongation factor Tu gene used in differentiation and classification of phytoplasmas. *Microbiology* 143, 3381-3389.
- Schneider, B., Seemüller, E., Smart, C. D., Kirkpatrick, B. C., 1995. Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas. In: *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmaology*, Vol. 2. Ed. by Razin, S.; Tully, J. G. New York: Academic Press, pp. 369-380.
- Smart, C.D., Schneider, B., Blomquist, C.L., Guerra, L. J., Harrison, N.A., Ahrens, U., Lorenz, K.H., Seemüller, E., Kirkpatrick, B., 1996. Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of the 16S-23S rRNA spacer region. *Appl. and Environ. Microbiol.* 62, 2988-2993.
- Seemüller, E., Marcone, C., Lauer, U., Ragozzino, A. Göschl, M., 1998. Current status of molecular classification of the phytoplasmas. *J. Plant Pathol.* 80, 3-26.
- Skrzeczkowski, L.J., Howell, W.E., Eastwell, K.C., Cavileer, T.D., 2001. Bacterial sequences interfering in detection of phytoplasma by PCR using primers derived from the ribosomal RNA operon. *Acta Hort.* 550 (2), 417-424.
- Thomson, D. Diezgen, R.G., 1995. Detection of DNA and RNA plant viruses by PCR and RT-PCR using a rapid virus release protocol without tissue homogenization. *J. Virol. Meth.* 54, 85-95.
- Waterworth, H.E., Mock, R., 1999. An assessment of nested PCR to detect phytoplasmas in imported dormant buds and internodal tissues of quarantined tree fruit germplasm. *Plant Dis.* 83, 1047-1050.
- Yu, Y.L., Yeh, K.W., Lin, C.P., 1998. An antigenic protein gene of a phytoplasma associated with sweet potato witches' broom. *Microbiology* 144, 1257-1262.

# 7

## Conclusiones generales

En Cataluña la enfermedad de PD la causa un único fitoplasma, perteneciente al grupo 16SrX; el fitoplasma 16SrX-C o del Decaimiento del peral.

La enfermedad de PD está ampliamente distribuida en Cataluña, y se ha detectado en todas las variedades analizadas. Sin embargo, los resultados indican que posiblemente en los últimos años haya habido una remisión de síntomas.

Se ha estudiado la evolución, a lo largo del año, de la sintomatología asociada a la enfermedad en tres variedades de peral (Bartlett, Limonera y Blanquilla). Los meses de Septiembre y Octubre son los más adecuados para realizar una valoración aproximada de árboles infectados, antes del inicio de la senescencia de los árboles.

Cada una de las tres variedades expresa una sintomatología característica, siendo la variedad Limonera la que presenta mayor susceptibilidad a la enfermedad, y Blanquilla la más tolerante.

Existe una correlación positiva entre el número de árboles que expresan síntomas y la proporción de éstos que se detectan por PCR. En cambio, es posible detectar por amplificación árboles infectados por el fitoplasma, sin que estos presenten síntomas de la enfermedad. Por lo tanto, la PCR es una técnica más fiable para analizar si un peral está afectado por la enfermedad de PD.

La detección del fitoplasma de PD por amplificación de su ADN en perales de la zona mediterránea, presenta un patrón estacional. Diciembre se presenta como el momento idóneo para obtener una buena detección. En primavera, con la formación de los nuevos brotes, la detección del fitoplasma disminuye a los niveles más bajos.

Es recomendable realizar la detección del fitoplasma de PD a partir de muestras de tallo, tanto por los elevados porcentajes de detección del fitoplasma, en comparación con nervios de hoja y yemas, como por el hecho de ser un material que puede ser analizado durante todo el año.

Los fitoplasmas que se encuentran en la parte aérea durante el invierno son capaces de transmitir la enfermedad mediante la técnica de injerto, por lo que el uso de yemas o estaquillas tomadas en esta época para la propagación de una variedad podría diseminar la enfermedad.

*Cacopsylla pyri* es el vector principal del fitoplasma de PD en España y presenta un patrón de infección estacional, que coincide con la detección estacional del fitoplasma en perales del área mediterránea.

Los dos sexos de *C. pyri* tienen la misma capacidad de adquirir el fitoplasma, sin embargo, las hembras lo transmiten más fácilmente.

La psila invernal puede mantener el fitoplasma de PD durante la diapausa, pudiendo infectar en primavera nuevos perales sanos.

El uso del medio nutritivo azucarado para evaluar la capacidad de transmisión del fitoplasma de PD por *C. pyri*, es eficaz, y se propone como una alternativa a los ensayos de transmisión en planta.

La combinación de técnicas nuevas y antiguas como son el gradiente de CICs-bisbenzimidida y el tratamiento con la enzima de restricción *AseI* y posterior ligación a adaptadores, amplificación y clonación, permite obtener una batería de fragmentos de ADN que en más de un 90% de los casos son de origen fitoplasmático.

La mayoría de cebadores diseñados a partir de estos fragmentos, amplifican específicamente para ADN de fitoplasma.

Dos pares de cebadores, diseñados a partir de los fragmentos de ADN no ribosómicos 7 y 14, amplifican el ADN de los fitoplasmas de PD y AP, y en cambio no amplifican para el resto de fitoplasmas, mostrando la estrecha relación existente entre ambos fitoplasmas.

Los fragmentos de ADN 7 y 14 utilizados como sondas no radiactivas, reconocen por hibridación por dot.blot el fitoplasma de PD en perales, vinca e insectos infectados. Además, ambas sondas son igual de sensibles que la técnica de nested-PCR para detectar el fitoplasma de PD en el vector, *C. pyri*.

## 8

## Anexos

## Anexo I

## Plagas del peral

Plaga: Nombre común	Agente causal
Acaro blanco	<i>Epitrimerus pyri</i>
Araña roja	<i>Panonychus ulmi</i>
Araña blanca	<i>Tetranychus urticae</i>
Barrenador de la madera	<i>Zeuzera pyrina</i>
Barreno de la corteza	<i>Synanthedon myopaeformis</i>
Cacoecia, roedora de la piel	<i>Cacoecimorpha pronubana</i>
Capua, oruga roedora de la piel	<i>Adoxophyes orana</i>
Carpocapsa	<i>Cydia pomonella</i> (L.)
Cigarrero	<i>Dasineura pyri</i>
Cosus	<i>Cossus cossus</i>
Erinosis del peral	<i>Eriophyes pyri</i>
Filoxera del peral	<i>Aphanostigma pyri</i>
Gusano cabezudo	<i>Capnodis tenebrionis</i>
Hoplocampa	<i>Hoplocampa brevis</i>
Minadora circular	<i>Leucoptera malifoliella</i>
Minadora punteada	<i>Phyllonorycter blancardella</i>
Minadora translúcida	<i>phyllonorycter corylifoliella</i>
Mosca de la fruta	<i>Ceratitits capitata</i>
Picabrotes	<i>Janus compresus</i>
Piojo de San José	<i>Quadraspidiotus perniciosus</i>
Psila	<i>Cacopsylla pyri</i>
Pulgón ceniciento	<i>Dysaphis pyri</i>
Pulgón verde	<i>Aphis pomi</i>
Tigre del peral	<i>Stephanitis pyri</i>

## Enfermedades del peral

### Hongos y bacterias

Nombre común	Agente causal
Chancro común	<i>Nectria galligena</i>
Fuego bacteriano	<i>Erwinia amylovora</i>
Mal blanco	<i>Phyllactinia guttata</i>
Mal de cuello	<i>Phytophthora cactorum</i>
Mancha negra	<i>Pleospora allii</i>
Momificado de frutos	<i>Monilinia fructigena</i>
Moteado del peral	<i>Venturia pyrina</i>
Phomopsis	<i>Diaporthe eres</i>
Podredumbre blanca	<i>Armillaria mellea</i>
Pseudomona	<i>Pseudomonas syringae</i>
Rosellina	<i>Rosellina necatrix</i>
Roya	<i>Gymnosporangium fuscum</i>
Septoria	<i>Mycosphaerella pyri</i>
Sphaeropsis	<i>Botryosphaeria obtusa</i>
Tumor de cuello y raíces	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>

### Virus, viroides y fitoplasmas

Nombre común	Agente causal
Viroide de la piel cicatrizada de la manzana	<i>Apple scar skin viroid, ASSVD</i>
Viroide de los chancros pustulosos del peral	<i>Pear blister canker viroid, PBCVd</i>
Virus de las manchas cloróticas del manzano	<i>Apple chlorotic leaf spot trichovirus, ACLSV</i>
Virus del mosaico del manzano	<i>Apple mosaic ilarvirus ApMV</i>
Virus de la madera asurcada del manzano	<i>Apple stem grooving capillovirus, ASGV</i>
Virus de las depresiones de la madera del manzano	<i>Apple stem pitting foveavirus, ASPV</i>
Madera de caucho del manzano	Apple Rubbery wood
Jaspeado amarillo del membrillero	<i>Quince yellow blotch virus</i>
Manchas de hollín sobre membrillero	<i>Quince sooty ringspot virus</i>
Decaimiento del peral	Pear decline, PD

**Anexo II****Clasificación de los fitoplasmas según Lee *et al*, 1998.**

<b>16S rRNA grupo (subgrupo)</b>	<b>Fitoplasma</b>	<b>Localización</b>
<b>16SrI (Grupo Aster yellows)</b>		
I(A)	Tomato big bud (BB)	Arkansas
I(B)	Michigan aster yellows (MIAY)	Michigan
I(C)	Clover phyllody (CPh)	Canadá
I(D)	Paulownia witches' broom (PaWB)	Taiwan
I(E)	Blueberry stunt (BBS1)	Michigan
I(F)	Apricot chlorotic leafroll (ACLR-AY)	España
I(K)	Strawberry multiplier (STRAWB 2)	Florida
<b>16SrII ( Grupo Peanut witches' broom)</b>		
II(A)	Peanut witches' broom (PnWB)	Taiwan
II(B)	Witches' broom of lime (WBDL) "Candidatus phytoplasma aurantifolia" Peninsula	Arabian
II(C)	Faba bean phyllody (FBP)	Sudan
II(D)	Sweet potato little leaf (SPLL)	Australia
<b>16SrIII (Grupo X- disease)</b>		
III(A)	X-disease (CX)	Canadá
III(B)	Clover yellow edge (CYE)	Canadá
III(C)	Pecan bunch (PB)	Georgia
III(D)	Goldenrod yellows (GR1)	New York
III(E)	Spirea stunt (SP1)	New York
III(F)	Milkweed yellows (MW1)	New York
III(G)	Walnut witches' broom (WWB)	Georgia
III(H)	Poinsettia branch-inducing	USA
III(I)	Virginia grapevine yellows (VGYIII)	Virginia
<b>16SrIV (Grupo Coconut lethal yellows)</b>		
IV(A)	Coconut lethal yellowing (LY)	Florida
IV(B)	Tanzanian coconut lethal decline (LDT)	Tanzania
<b>16rV (Grupo Elm yellows)</b>		
V(A)	Elm yellows (EY1)	USA
V(B)	Cherry lethal yellows (CLY)	China
V(C)	Flavescence dorée (FD)	Francia
<b>16SrVI (Grupo Clover proliferation)</b>		
VI(A)	Clover proliferation (CP)	Canadá
VI(B)	"Multicipita" phytoplasma	Canadá

16SrVII (Grupo Ash yellow)		
VII(A)	Ash yellow (Ash Y)	New York
16SrVIII (Grupo Loofah witches' broom)		
VIII(A)	Loofah witches' broom (LfWB)	Taiwan
16SrIX (Grupo Pigeon pea witches' broom)		
IX(A)	Pigeon pea witches' broom (PPWB)	Florida
16SrX (Grupo Apple proliferation)		
X(A)	Apple proliferation (AP)	Alemania
X(B)	Apricot chlorotic leafroll (ACLR)	Italia
X(C)	Pear decline (PD)	Italia
X(D)	Spartium witches' broom (SPAR)	Italia
X(E)	Black alder witches' broom (BAWB)	Alemania
16SrXI (Grupo Rice yellow dwarf (RYD))		
XI(A)	Rice yellow dwarf (RYD)	Japón
XI(B)	Sugarcane white leaf (SCWL)	Tailandia
XI(C)	Leafhopper-borne (BVK)	Alemania
16SrXII (Grupo Stolbur)		
XII(A)	Stolbur (STOL) (formalmente grupo 16SrI, Serbia subgrupo G)	
XII(B)	Australian grapevine yellows (AUSGY), "Candidatus Phytoplasma australiense" (antiguamente grupo 16SrI, subgrupo J)	
16SrXIII (Grupo Mexican periwinkle virescence)		
XIII(A)	Mexican periwinkle virescence (MPV)Méjico (antiguamente grupo 16SrI, subgrupo I)	
16SrXIV (Grupo Bermudagrass white leaf)		
XIV(A)	Bermudagrass white leaf (BGWL)	Tailandia