



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**Determinación de la capacidad de
transmisión de fitoplasmas en dos
morfoespecies de la familia
Cicadellidae (Hemiptera:
Auchenorrhyncha) de Bogotá D.C.**

Laura Margarita Perilla Henao

**Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias
Departamento de Química
Bogotá, Colombia
2013**

**Determinación de la capacidad de transmisión de
fitoplasmas en dos morfoespecies de la familia
Cicadellidae (Hemiptera: Auchenorrhyncha) de
Bogotá D.C.**

LAURA MARGARITA PERILLA HENAO

Biólogo, Universidad Militar Nueva Granada

**Tesis de Maestría presentada como requisito parcial para optar al título de
Magíster en Ciencias – Bioquímica**

Director: Liliana Franco Lara

Ph.D., Profesor Asociado, Facultad de Ciencias Básicas y Aplicadas
Universidad Militar Nueva Granada.

Codirector: Carlos Yesid Soto Ospina

Ph.D., Profesor Asociado, Departamento de Química, Facultad de Ciencias
Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá.

**Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias
Departamento de Química
Bogotá, Colombia
2013**

*A José Guillermo Perilla Alfonso y
María Stella Henao Castaño,
quienes han sido el instrumento de Dios
para colmar mi vida de bendiciones.*

Agradecimientos

A la Dra. Liliana Franco Lara, por abrirme las puertas en su grupo de investigación y por la confianza depositada en el desarrollo de este trabajo que me ha permitido crecer profesional y personalmente.

A la Universidad Militar Nueva Granada, Vicerrectoría de Investigaciones por la financiación de los proyectos CIAS 550 y CIAS 710.

A la BSPP (*British Society of Plant Pathology*) por el apoyo económico recibido en la beca "*M.Sc Bursary*" para la estancia de investigación en Inglaterra y posteriormente el "*Travel fund*" para presentar algunos resultados de este trabajo de investigación.

Al Dr. Matthew Dickinson (The University of Nottingham, Reino Unido), por permitirme aprender en su grupo de investigación.

Al Dr. Mike Wilson (Museo de Historia Natural de Gales, Reino Unido) por su colaboración en las técnicas de muestreos y en la identificación de insectos.

A Juan Manuel Vargas (ICA, Colombia), por su oportuna guía en la observación de morfoespecies de cicadélidos.

A la Dra. Assunta Bertaccini (Universidad de Bologna, Italia) y al Dr. Nigel Harrison (Universidad de la Florida, USA), por las muestras de ADN control.

A la Universidad Nacional de Colombia, por la beca exención en derechos académicos, por su apoyo institucional y en especial al Dr. Carlos Yesid Soto por su voto de confianza y dirección oportuna.

Contenido

	Pág.
Lista de figuras	IX
Lista de tablas	XI
Lista de abreviaturas	XIII
Resumen	15
Abstract	17
1. JUSTIFICACIÓN	21
2. MARCO TEÓRICO	23
2.1 Características de Fitoplasmas.....	23
2.2 Enfermedades causadas por Fitoplasmas	24
2.3 Mecanismos de Transmisión de Fitoplasmas	28
2.4 Detección y Clasificación de Fitoplasmas	30
2.5 Genoma de Fitoplasmas	34
3. HIPÓTESIS EXPERIMENTAL	39
4. OBJETIVOS	41
4.1 Objetivo general	41
4.2 Objetivos específicos	41
5. MATERIALES Y MÉTODOS	43
5.1 Localización de zona de estudio.....	43
5.2 Obtención de material biológico.....	43
5.3 Detección de Fitoplasmas.....	45
5.4 Clonación de Productos de PCR	49
5.5 Análisis bioinformático de secuencias del gen 16S rRNA de fitoplasmas.....	50
5.6 Ensayos de transmisión.....	51

5.7	Detección por PCR de genes con importancia potencial en la interacción vector-patógeno.....	52
6.	RESULTADOS.....	54
6.1	Determinación de morfoespecies de la familia Cicadellidae portadoras de fitoplasmas en Bogotá.....	55
6.2	Evaluación de la capacidad de transmisión de fitoplasmas en condiciones experimentales.....	77
6.3	Evaluación preliminar de detección por PCR genes potenciales en la interacción vector-patógeno.	83
7.	DISCUSIÓN.....	87
8.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	97
Anexo A:	Mapas de localización de zonas de muestreo.....	99
Anexo B:	Secuencias de referencia de fitoplasmas.....	101
Anexo C:	Nomenclatura muestras de ADN.....	103
Anexo D:	Lista de secuencias.....	107
Anexo E:	Análisis bioinformático.....	111
Anexo F:	Patrones RFLP de amplicones (R16F2n/R16R2) obtenidos en cicadélidos en Bogotá	115
Anexo G:	Patrones RFLP de ensayos de transmisión	123
Anexo H:	Secuencias región amplificada Rnc-1/PssA1	131
Anexo I:	Ponencias y publicaciones	133
BIBLIOGRAFÍA	137

Lista de figuras

Figura 2-1. Representación diagramática de los genes IDP de fitoplasmas

Figura 5-1. Principales partes en la morfología externa de la familia Cicadellidae

Figura 5-2. Separación de haces vasculares (HV) en tallos de *F. uhdei*

Figura 5-3. Mapa del Vector pGEM-T Easy

Figura 5-4. Fotografía del interior de una jaula de un ensayo de transmisión

Figura 5-5. Perfiles térmicos usados en las reacciones de amplificación por PCR

Figura 5-6. Parejas de iniciadores y producto esperado en reacción primaria y anidada del gen *secA* de fitoplasmas

Figura 6-1. Fotografías de las morfoespecies de cicadélidos colectados en Bogotá en las dos áreas de estudio

Figura 6-2. Árboles de *Pittosporum undulatum* con síntomas de fitoplasmosis en Bogotá

Figura 6-3. Fotografías de árboles de *P. nigra* con síntomas de fitoplasmosis

Figura 6-4. Fotografías de *Croton* spp. con síntomas de fitoplasmosis

Figura 6-5. Electroforesis de ADN genómico

Figura 6-6. Detección de fitoplasmas en ADN total de cicadélidos por reacciones anidadas consecutivas

Figura 6-7. Comparación de amplicones R16F2n/R16R2 en detección de fitoplasmas en cicadélidos por reacciones anidadas consecutivas

Figura 6-8. Evaluación de ausencia de inhibidores para PCR en ADN total de plantas.

Figura 6-9. Detección de fitoplasmas en árboles aledaños a *F. uhdei* en Bogotá

Figura 6-10. Detección de fitoplasmas por PCR anidada en muestras de árboles de Bogotá

Figura 6-11. Detección de fitoplasmas en árboles e insectos

Figura 6-12. Dendograma de distancias la región R16F2n/R16R2 de fitoplasmas en arboles de Bogotá

Figura 6-13. Dendograma de secuencias región fU5/rU3 de fitoplasmas obtenidas en cicadélidos

Figura 6-14. Patrón de RFLP *in silico* de secuencias obtenidas consenso con los iniciadores R16F2n/R16R2 en *P. undulatum*

Figura 6-15. Comparación del patrón de restricción *in silico* entre grupos 16Srl-A, 16SrIII-A, 16SrV-A, 16SrVII-A y 16Sr XII-A

Figura 6-16. Comparación por RFLP *in silico* de la región R16F2n/R16R2 de los grupos de fitoplasmas 16Srl y 16SrVII encontrados en *F. uhdei* en Bogotá

Figura 6-17. RFLP de amplicones obtenidos con R16F2n/R16R2 a partir de ADN total de árboles

Figura 6-18. RFLP de amplicones obtenidos con R16F2n/R16R2 con la enzima *MseI* a partir de ADN total de insectos

Figura 6-19. Fotografías ventrales de morfoespecies de ensayos de transmisión

Figura 6-20. Cambios en la morfología de hojas observados en fríjoles expuestos a cicadélidos

Figura 6-21. Detección de fitoplasmas en individuos de las morfoespecies MF04 y MF06 usadas en ensayos de transmisión

Figura 6-22. Evaluación de la presencia de fitoplasmas en plantas de fríjol expuestas a insectos de las morfoespecies MF04 y MF06, 13 semanas post-inoculación

Figura 6-23. Ensayo de PCR con iniciadores ES-1/Nad-2 y Rnc-1/PssA1

Figura 6-24. Evaluación de amplificación de gen *SecA*

Lista de tablas

Tabla 2-1. Grupos 16S rRNA de Fitoplasmas.

Tabla 2-2. Fitoplasmas en los que se han descrito secuencias de genes de proteínas inmunodominantes.

Tabla 5-1. Iniciadores utilizados en las reacciones de detección de fitoplasmas sobre la región 16S rRNA-23S rRNA.

Tabla 5-2. Parejas de iniciadores utilizadas, temperaturas de anillamiento y producto esperado.

Tabla 5-3. Controles positivos, ADN total de plantas infectadas con diferentes cepas de fitoplasmas.

Tabla 5-4. Secuencias de los iniciadores que amplifican región con genes *Amp* e *Imp* de fitoplasmas.

Tabla 5-5. Secuencias de iniciadores para amplificación gen *SecA*.

Tabla 6-1. Sitio de recolección y hábitat de las morfoespecies de cicadélidos colectados en muestreos en las dos áreas de estudio.

Tabla 6-2. Detección de fitoplasmas en morfoespecies de cicadélidos de Bogotá con diferentes iniciadores en PCR.

Tabla 6-3. Detección de fitoplasmas en árboles cercanos a *F. uhdei* en Bogotá.

Tabla 6-4. Grupos de fitoplasmas por RFLP y secuenciación encontrados en cicadélidos de Bogotá.

Tabla 6-5. Ensayos de transmisión de fitoplasmas.

Tabla B-1. Secuencias utilizadas en alineamientos múltiples para comparación con las secuencias encontradas en Bogotá

Tabla C-1. Lista de muestras de ADN total de cicadélidos muestreados en Bogotá

Tabla C-2. Lista de muestras de ADN total de árboles.

Tabla C-3. Lista de muestras de ADN total de insectos y frijol de ensayos de transmisión.

Tabla D-1. Secuencias de amplímeros obtenidos a partir de ADN total de árboles.

Tabla D-2. Secuencias de amplímeros obtenidos de ADN total de morfoespecies de cicadélidos.

Tabla D-3. Secuencias de amplímeros obtenidos de ADN total de frijol post-inoculación con cicadélidos.

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Término
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Amp	Ampicilina
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA	Albumina de suero bovino
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
dNTP	Desoxinucleótido trifosfato
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
HMA	Movilidad heteroduplex
IDP	<i>Immunodominant membrane protein</i>
IPTG	Isopropil- β -D-thiogalactopiranosido
IRPMC	<i>International Research Programme for Comparative Mycoplasmaology</i>
Kpb	Kilo pares de bases
LAMP	<i>Loop-mediated isothermal amplification</i>
LB	Luria Bertani
m.s.n.m.	Metros sobre el nivel del mar
MF	Morfoespecie
MFNa	Morfoespecie no asignada
MLO's	Organismos parecidos a Micoplasmas
MLST	<i>Multilocus Sequence Typing</i>
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFGE	Electroforesis de campo pulsado
PMU	Potencial unidad móvil, en el genoma de fitoplasmas
PVP	Polivinil-pirrolidona
RFLP	<i>Restriction fragment length polymorphism</i>
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SOC	Medio nutritivo
TE	Tris-EDTA
Tm	Temperatura de 'melting'
UMNG	Universidad Militar 'Nueva Granada'
UNAL	Universidad Nacional de Colombia

Resumen

Los fitoplasmas son bacterias fitopatógenas que carecen de pared celular, especializadas en la colonización intracelular del floema de plantas, son transmitidos por insectos vectores del suborden Auchenorrhyncha (Hemiptera) y están entre los seres vivos con menor tamaño. Los fitoplasmas forman un grupo monofilético en la clase Mollicutes que causan alteraciones morfológicas y fisiológicas en plantas ornamentales, hortícolas, maderables, frutales y cultivos en todo el mundo. No existen métodos de control efectivos para las enfermedades causadas por fitoplasmas y solo en pocos cultivos de gran importancia económica como vid o frutales perennes, se realizan programas de monitoreo y detección temprana que parten del conocimiento de aspectos epidemiológicos de los fitoplasmas. Estas bacterias son difícilmente cultivables y por esta razón se estudian principalmente por métodos moleculares; su detección se basa en información de genes conservados y están incluidos a nivel de género en el taxón provisional '*Candidatus* phytoplasma'.

Las relaciones entre fitoplasmas, sus hospederos vegetales y los vectores transmisores son complejas, por lo que su estudio es un prerrequisito indispensable para establecer estrategias de mitigación. En Colombia, se han reportado fitoplasmas en especies de importancia económica como palma, café, yuca y papa, pero no se conocen los insectos vectores. Reportes anteriores indican que en Bogotá árboles urbanos están infectados con fitoplasmas, en la especie *Fraxinus uhdei* el grupo 16SrVII y en *Liquidambar styraciflua* con los grupos 16SrI, 16SrV, 16SrVII y 16SrXII, los cuales causan síntomas que cambian la apariencia general de los árboles y afectan su funcionalidad ornamental. Adicionalmente, la presencia de plantas infectadas con fitoplasmas (como fuente de inóculo) sumado al desconocimiento de los vectores, representa un potencial riesgo de dispersión a otras especies ornamentales y de interés comercial.

En el presente trabajo, se seleccionaron nueve morfoespecies (llamados así porque no hay información previa de las especies de cicadélidos de Bogotá) de la familia Cicadellidae presentes en pastizales cercanos a árboles con fitoplasmosis, con el objetivo de identificar potenciales insectos vectores de fitoplasmas en la Sabana de Bogotá y de evaluar su capacidad de transmisión. Mediante PCR anidada (utilizando el gen 16S rRNA), RFLP y secuenciación, se detectó la presencia de fitoplasmas de los grupos 16SrVII y 16SrI en las nueve morfoespecies evaluadas.

Se realizaron ensayos de transmisión para dos morfoespecies de la subfamilia Cicadellinae portadoras de fitoplasmas. Los resultados obtenidos de síntomas en frijol como hospedero experimental y de pruebas moleculares muestran la capacidad de estas

morfoespecies para transmitir fitoplasmas, con lo que se reporta por primera vez en el mundo un vector para el grupo 16SrVII, y por primera vez para Colombia vectores del grupo 16Srl. Ambas morfoespecies son vectores de fitoplasmas 16Srl y 16SrVII, pero la morfoespecie MF06 transmite con la misma eficiencia los dos grupos de fitoplasmas, mientras que la morfoespecie MF04 es más eficiente para transmitir el grupo de fitoplasmas 16Srl.

Además este trabajo presenta la primera evidencia, de la presencia de fitoplasmas del Grupo 16Srl en *F. uhdei*, *Populus nigra*, *Pittosporum undulatum* y *Croton* spp., especies de árboles de la cobertura urbana de Bogotá. La evidencia experimental indica que en las especies *P. nigra* y *Croton* spp. y en cinco morfoespecies de cicadélidos se presentan infecciones mixtas de fitoplasmas 16Srl y 16SrVII. Este es un primer aporte al conocimiento de las relaciones ecológicas y epidemiológicas de los fitoplasmas y sus vectores en Bogotá. Además, se presentan ensayos preliminares de amplificación de secuencias de genes no ribosomales, útiles en la delimitación fina de subgrupos de los fitoplasmas.

Palabras clave: Fitoplasmosis, Vectores de fitoplasmas, cicadélidos, Infecciones mixtas, *Ash yellows* (16SrVII), *Aster yellows* (16Srl), 'Candidatus phytoplasma'

Abstract

Phytoplasmas are plants phloem-specialized bacteria without cell wall transmitted by insects in Auchenorrhyncha suborder (Hemiptera). They are among the smaller self-replicative organisms and have small genomes. Phytoplasmas are a diverse monophyletic group in class Mollicutes, which cause multiple morphological and physiological changes in ornamental, crops, fruit trees and crops around the world. Until date there are not effective control methods to limit infections of phytoplasmas, but in economic important crops as perennial tree fruits and grapes there are monitoring and early detection programs, which are established after unraveling some epidemiological aspects. Phytoplasmas are difficult to culture and they are studied by molecular methods. The DNA information from conserved genes is useful for detection and they are represented at genus level by the provisional taxon '*Candidatus phytoplasma*'.

Relationships among phytoplasmas, plant host and vectors are complex and their studies are necessary to establish control measures. In Colombia there are reports of phytoplasmas in economic important crops as oil palm, coffee, cassava and potato but the insect vectors remain unknown. Previous reports indicated that urban trees in Bogotá city as *Fraxinus uhdei* and *Liquidambar styraciflua* are infected with Group 16SrVII phytoplasmas in the first case and 16SrI, 16SrV, 16SrVII and 16SrXII in the former. Phytoplasmas infection causes symptoms in the trees that changes the general appearance and affects their ornamental function. Plants infected by phytoplasmas can act as source of inoculum to other ornamental or commercial species and represent a potential risk since the vectors are unknown.

In order to identify potential insects vectors of phytoplasmas at Bogota Savannah and to evaluate the transmission ability, nine leafhoppers morpho-species (referred like that because there is no previous information about the taxonomic identity of this leafhopper species from Bogota) were selected from samplings on grasses nearby trees with phytoplasmosis. Through PCR amplification of regions of the gene 16SrRNA, RFLP and sequence analysis were detected phytoplasmas group 16SrI or 16SrVII in the nine evaluated morpho-species.

Using two leafhoppers morpho-species, transmission trials were performed, here are presented molecular and symptomatological evidence of transmission of this morpho-species to transmit phytoplasmas to an experimental host. This is the first known report worldwide of a vector for phytoplasma group 16SrVII, and for Colombia vectors of group 16SrI. Leafhopper morpho-specie MF06 transmits equally both phytoplasmas groups, while morpho-specie MF04 seems to be more efficient transmitting group 16SrI phytoplasmas.

This work presents also the first evidence of phytoplasmas infection in four tree species of urban green coverage in Bogota. Species *F. uhdei*, *Populus nigra*, *Pittosporum undulatum* and *Croton* spp., are reported to be infected with 16Srl, experimental evidence show also mixed infection among phytoplasmas group 16Srl and 16SrVII. Mixed infections were detected in *P. nigra* y *Croton* spp. as well as in five leafhopper morpho-species, however ecological relationships remain undetermined. Additionally, are presented preliminary essays to amplify gene sequences different to ribosomal gene, useful in finer subgroup phytoplasmas delimitation.

Keywords: Phytoplasmosis, Vectors, Leafhoppers, Mixed infections, *Ash yellows* (16SrVII), *Aster yellows* (16Srl), 'Candidatus phytoplasma'.

1. JUSTIFICACIÓN

Los fitoplasmas son agentes etiológicos causales de enfermedades de plantas de cientos de especies vegetales vasculares. Las enfermedades causadas por fitoplasmas en plantas se relacionan con perturbaciones morfológicas y funcionales tanto en la parte vegetativa como reproductiva de las plantas. A nivel mundial preocupa la aparición de enfermedades emergentes asociadas a estas bacterias en cientos de cultivos y especies ornamentales para las que estas enfermedades son nuevas. Uno de los casos cuantificados del impacto negativo de los fitoplasmas es en cultivos de manzana en Europa, que causaron pérdidas de aproximadamente 125 millones de euros durante el 2001 (Strauss, 2009). En Italia existen rigurosas medidas de control para evitar la dispersión de la diversidad de fitoplasmas que causan el complejo de enfermedades conocidas como Grapevine Yellows (que incluyen Flavescence doré y Bois Noir), entre los que se encuentran la eliminación de árboles infectados, indexación del material para propagación, detección temprana de los diferentes grupos de fitoplasmas, monitoreo de las poblaciones de vectores y control químico (Belli *et al.*, 2010). Observaciones de los últimos 20 años muestran el aumento de las especies vegetales susceptibles y que no existen estrategias efectivas para el manejo de fitoplasmas (Strauss, 2009).

Las enfermedades de plantas causadas por fitoplasmas son poco conocidas en Colombia y sólo se encuentran reportes de fitoplasmas del grupo 16SrVII en Urapán (Filgueira *et al.*, 2004; Franco-Lara y Filgueira, 2005), del grupo 16SrIII en *Solanum quitoense* (Betancourt & Villamar, 2004) y *Coffea arabica* (Galvis *et al.*, 2007) y los grupos 16SrV y 16SrXII en *Solanum tuberosum* (Mejía *et al.*, 2011). En ninguno de los reportes se conocen los insectos vectores transmisores.

La cobertura arbórea de Bogotá además de la producción de oxígeno, genera aportes biológicos, ambientales y económicos. Es así como los árboles son nicho de especies, corredores biológicos, refugio de aves, controladores de erosión y del mantenimiento de los cuerpos de agua. Además aportan confort climático, dan sombrío, son barreras de ruido, ayudan a la captura de partículas en suspensión y generan otros beneficios como la valoración de la propiedad, producción de frutos, forraje, medicinales, aporte estético o sensorial con fragancias (Tovar, 2007). En conjunto, todos estos aspectos deben ser tenidos en cuenta al valorar el estado fitosanitario del arbolado urbano. En el caso de Bogotá la disponibilidad de espacios verdes en la capital de Colombia es de 4,93 m²/hab¹, cifra muy inferior a la establecida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (óptimo 15 m²/hab y mínimo 10 m²/hab), ello implica que los problemas

¹Observatorio de Espacio Público de Bogotá, editado por la Cámara de Comercio de Bogotá. Enlace: http://camara.ccb.org.co/documentos/4486_observatorio_del_espacio_publico_de_bogota_no._1.pdf

fitosanitarios del arbolado urbano, inciden en una disminución de la funcionalidad del arbolado y a largo plazo representan una reducción en los indicadores de calidad de vida de la ciudad.

En árboles ornamentales *Fraxinus uhdei* de Bogotá, el grupo de investigación Fitoplasmas y Virus de la Universidad Militar Nueva Granada (UMNG) reportó fitoplasmas del grupo 16SrVII entre los años 2003 y 2006 (Gaitán, 2003; Filgueira *et al.*, 2004; Franco-Lara y Filgueira, 2005), los que se reportaron primero en especies de oleáceas de Norte América. También se han realizado estudios de la presencia de fitoplasmas en la región Andina (Gutiérrez, 2006) y en otros árboles ornamentales como *Liquidambar styraciflua* (Franco-Lara *et al.*, 2010). En condiciones experimentales se han infectado con fitoplasmas hospederos alternativos como *Apium graveolens*, *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana debneyi* (Perilla *et al.*, 2010) y *Catharanthus roseus* (López y Filgueira, 2006). Sin embargo, la ecología y el potencial epidemiológico de los fitoplasmas se desconocen en la región, aunque existen avances preliminares que indican la presencia de insectos de la subfamilia Deltocephalinae que son portadores de fitoplasmas (Franco-Lara, comunicación personal).

La información reunida por nuestro grupo de investigación muestra la grave situación en la cual se encuentra actualmente el arbolado urbano de Bogotá y en general la Sabana de Bogotá, pues existe evidencia de que los fitoplasmas se están dispersando a cultivos de la región (Franco-Lara, comunicación personal). La importancia del presente trabajo radica en que este es el primer intento por identificar los insectos vectores de los fitoplasmas de Bogotá y por otro lado, la existencia de otras especies de árboles afectadas por fitoplasmosis, conocimiento necesario para establecer su potencial de dispersión a otras especies ornamentales o de interés comercial. Los fitoplasmas no son percibidos por la comunidad como un riesgo importante para los árboles. Sin embargo, el alto costo económico y ambiental de la pérdida de árboles ornamentales para la ciudad, sumado al riesgo latente que representan los árboles infectados para otras especies vegetales de interés comercial y agronómico de la Sabana de Bogotá, exigen una mayor atención por parte de las autoridades encargadas del manejo de árboles de la ciudad.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Características de Fitoplasmas

Los fitoplasmas son bacterias de la clase Mollicutes, que se reconocen desde los años 60 como causantes de alteraciones florales y vegetativas drásticas en las plantas vasculares. Los fitoplasmas habitan en el interior de las células del floema de plantas vasculares y en órganos internos de insectos fitófagos que se alimentan del contenido del floema. A partir de 1967, se designaron como MLO's (Organismos parecidos a micoplasmas, por su sigla en inglés) células procariotas pleomorfas no helicoides encontradas en el floema de plantas que presentaban síndromes complejos que incluían síntomas como virescencia, filodia, esterilidad de flores, proliferación de brotes axilares, elongación anormal de entrenudos y amarillamiento (Lee *et al.*, 2000; IRPCM 2004), los que anteriormente se atribuían a virus vegetales. El conocimiento de las propiedades de este grupo particular y único de bacterias que afectan la sanidad vegetal de diversas plantas, se ha generado conforme al avance de las herramientas metodológicas aplicables al estudio de microorganismos difíciles de aislar y cultivar en condiciones *in vitro*.

Por microscopía electrónica, los fitoplasmas se han observado como ultraestructuras con forma redondeada o alargada, rodeada por una membrana celular y colonizando exclusivamente los tubos cribosos del floema (Musetti y Favali, 2004). Carecen de pared celular rígida, pueden tener forma pleomórfica y su diámetro promedio puede variar entre 200 nm a 800 nm (Lee *et al.*, 2000; Musetti y Favali, 2004). Son sensibles a antibióticos como tetraciclina y a soluciones de sales hipotónicas (Lim *et al.*, 1992).

A mediados de la década de los 90 los MLO comenzaron a llamarse fitoplasmas (Revisado por Seemüller *et al.*, 1998 y Firrao *et al.*, 2005), cuando, con métodos moleculares se realizaron análisis comparativos de secuencias del gen ribosomal 16S rRNA y fue posible evidenciar que los fitoplasmas conforman un grupo monofilético grande altamente diverso dentro de la clase Mollicutes (Lee *et al.*, 1998). Luego, con el soporte de múltiples evidencias moleculares y biológicas, el equipo de trabajo en fitoplasmas/espiroplasmas del IRPCM- Grupo de taxonomía de fitoplasmas (2004), designó provisionalmente al género "*Candidatus* (*Ca.*) Phytoplasma", para referirse a la descripción taxonómica formal de procariotes sin pared celular, no helicoides que colonizan el floema de plantas y son transmitidos por insectos (IRPMC, 2004). Actualmente, la clase Mollicutes incluye bacterias sin pared celular como los micoplasmas, espiroplasmas, acholeplasmas y fitoplasmas (Wei *et al.*, 2007), todos miembros del orden Acholeplasmatales.

Diferentes aspectos de la biología básica, la taxonomía, la detección, las relaciones con sus vectores y hospederos, los mecanismos de patogenicidad de los fitoplasmas son poco conocidos debido a la dificultad de obtener cultivos *in vitro* puros de fitoplasmas. Durante más de 40 años se consideró que los fitoplasmas no se podían propagar en medio axénico y que dependían totalmente de su huésped vegetal o insecto (Hogenhout *et al.*, 2008), excluyéndolos de los métodos de clasificación que se aplica para los microorganismos cultivables (Seemüller *et al.*, 1998). Recientemente, Contaldo y colaboradores (2012) describieron por primera vez una metodología que permite cultivar en medios líquido y sólido siete cepas² de fitoplasmas que se habían mantenido por años en plantas *in vitro* de *Catharanthus roseus*. El tiempo requerido para generar cambio de color en el medio líquido fue entre 15 a 102 días y la cepa que más colonias produjo, generó entre 10 y 20 en medio sólido (Contaldo *et al.*, 2012). Este gran avance abre la puerta al estudio de muchos aspectos de los fitoplasmas pero es poco probable que pueda usarse para análisis rutinarios.

2.2 Enfermedades causadas por Fitoplasmas

Distribución de los fitoplasmas en plantas

Las infecciones de fitoplasmas se han descrito por lo menos en 700 especies y 98 familias de plantas tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas (Hogenhout *et al.*, 2008). En plantas vasculares los fitoplasmas se encuentran al interior de los elementos cribosos del floema, excepcionalmente se han detectado fitoplasmas en el parénquima y se pueden encontrar zonas de baja concentración y otras de muy alta concentración en una misma planta (Saracco *et al.*, 2006).

Según el hospedero se pueden encontrar diferencias en la concentración de fitoplasmas, por ejemplo herbáceas como *Catharanthus roseus*, lechuga, apio, tabaco y del género *Brassica* spp. se caracterizan por presentar altos títulos (Marcone, 2010). En plantas leñosas, la concentración de fitoplasmas suele ser baja a pesar de lo cual producen síntomas severos e incluso letales.

La distribución de los fitoplasmas al interior del floema puede ser irregular, sin embargo, en algunas plantas herbáceas se ha observado acumulación de los fitoplasmas hacia las regiones de crecimiento activo en las plantas con síntomas, estos órganos actúan como

² En inglés, el término '*strain*' se usa para referirse a poblaciones distintas de fitoplasmas, en cuanto a relación genética, biológica o epidemiológica. En este documento se utiliza el término 'cepa' como traducción más cercana, y no corresponde al sentido estricto que aplica para cepa en microorganismos cultivables.

sumideros metabólicos hacia donde se mueven los nutrientes a través del floema (Christensen *et al.*, 2005). En el caso del fitoplasma del amarillamiento del crisantemo (Grupo16Srl), no sólo su distribución es diferencial, sino que también la multiplicación de fitoplasmas se da sólo en los brotes jóvenes y las raíces y no en hojas viejas basales (Saracco *et al.*, 2006). Por el contrario en poinsetias, los fitoplasmas (Grupo 16SrIII) colonizan y se acumulan preferencialmente en hojas maduras o fuente metabólicas, mientras en los órganos sumidero (hojas jóvenes y raíces) se presenta baja concentración del patógeno (Marcone, 2010).

Por otra parte, en los países con estaciones marcadas, la colonización de fitoplasmas de las partes aéreas de los hospederos leñosos caducifolios, presenta fluctuaciones estacionales. Durante el invierno la concentración de fitoplasmas se disminuye a niveles imperceptibles en la parte aérea, pero los fitoplasmas persisten en las raíces y posteriormente, en primavera recolonizan las partes aéreas. Ese patrón aparentemente se relaciona con la nueva formación de tubos cribosos maduros (Kison y Seemüller, 2001). Uno de los factores que pueden retardar o acelerar la colonización de fitoplasmas una vez se ha infectado la planta, es la infección con más de una cepa de fitoplasma con diferentes combinaciones de agresividad (Oshima *et al.*, 2007).

Sintomatología asociada a fitoplasmas

Los cambios morfológicos en la estructura de la planta o de órganos que se han observado en plantas infectadas con fitoplasmas son diversos y dependen del tipo, edad de planta hospedera, de la cepa de fitoplasma que coloniza, de la etapa de la enfermedad e incluso de condiciones ambientales (Lee *et al.*, 2000). Se ha observado que la presencia de fitoplasmas causa alteraciones en la translocación de fotosintatos; probablemente por obstrucción del transporte de nutrientes por el floema, lo cual lleva a que se acumulen cantidades anormales de carbohidratos en hojas fuente mientras se reducen los niveles en los órganos sumidero como hojas jóvenes y raíces (Christensen *et al.*, 2005). También se presentan alteraciones en las funciones fisiológicas como reducción en la fotosíntesis, en la conductancia estomatal y respiración en las raíces. Otros cambios relacionados con infecciones de fitoplasmas son diferencias en el metabolismo secundario y perturbaciones en el balance de fitohormonas (Favali *et al.*, 2004; Fontaniella *et al.*, 2003), lo cual puede explicar, en parte, las alteraciones morfológicas y los síntomas que exhiben las plantas infectadas.

Los síntomas causados por los fitoplasmas sugieren por un lado perturbaciones en el balance de los reguladores de crecimiento de las plantas hospederas y por otro, desórdenes en el funcionamiento del floema (Christiansen *et al.*, 2005). Los síntomas pueden estar relacionados con mecanismos agresivos de transporte de carbohidratos

hacia el interior de los fitoplasmas o según la tasa de multiplicación del patógeno (Oshima *et al.*, 2007).

Algunos síntomas se observan como anomalías en la flor como decoloración, virescencia, filodia, brotes gigantes, proliferación de brotes florales, que incluso resultan en esterilidad o deformación de los frutos (Marcone, 2010). Otros síntomas de fitoplasmas incluyen la formación de escobas de bruja, filodia (metamorfosis de órganos florales en hojas), virescencia (coloración verde de pétalos), elongación de tallos, formación de brotes en copos, enrojecimiento de hojas y tallos, enanismo, arrosamiento de las ramas, proliferación de brotes, amarillamiento, necrosis del floema y decaimiento (Lee *et al.*, 2000; Hogenhout *et al.*, 2008; Bertaccini y Duduk, 2009). En plantas leñosas se pueden observar síntomas como amarillamiento, enrojecimiento, hojas pequeñas, hojas entorchadas, aclaramiento de venas, alargamiento de venas, necrosis de venas, defoliación prematura, coloración de otoño prematura, frutos pequeños, crecimiento terminal pobre, follaje disperso, muerte regresiva (“*dieback*”), atrofia y decaimiento (Lee *et al.*, 2000). En algunos casos pueden haber plantas que incluso estando infectadas con fitoplasmas, carecen de síntomas en todo su tiempo de vida (Marcone, 2010).

Fitoplasmosis en Colombia

En la década de 1990, los árboles de Urapán (*Fraxinus uhdei*³) de la ciudad de Bogotá comenzaron a presentar un grave deterioro fitosanitario, que inicialmente se asoció con la infestación del insecto fitófago *Tropidosteptes chapingoensis* (Hemiptera: Miridae), el que se presenta en altas poblaciones en los árboles de Urapán y genera daño foliar con la alimentación, reduciendo la capacidad fotosintética y defoliación del árbol (Pinzón y Pedreros, 1995). Posteriormente, con la combinación de herramientas de microscopía, detección con métodos moleculares (hibridación, PCR, RFLP, secuenciación de genes ribosomales) y transmisión desde árboles a hospederos experimentales se demostró la infección de fitoplasmas del grupo 16SrVII (*Candidatus* phytoplasma fraxini) en Urapanes de Bogotá y la zona andina (Griffiths *et al.*, 2001; Gaitán, 2003; Filgueira *et al.*, 2004; Franco-Lara y Filgueira, 2005; Gutiérrez, 2006; López y Filguiera, 2006). La fitoplasmosis en Urapán explica los cambios drásticos en la morfología de los árboles bogotanos tales como ramas en copo, ramas con muerte apical (*dieback*), ramificación delicuescente, brotes epicórmicos, ramas con hojas pequeñas y descortezamiento, los cuales se asocian con perturbaciones en el balance de reguladores de crecimiento y

³ En los listados del censo del arbolado urbano y documentos de las especies de árboles de Bogotá, se hace referencia a Urapán con el nombre científico *Fraxinus chinensis*; sin embargo, como se menciona en Filgueira *et al.* (2004) y en el sitio web de la Dra. Eva Wallander (<http://www.oleaceae.info/fraxinus/uhdei.html>) la especie es en realidad *Fraxinus uhdei* (Wenzig) Lingelsh.

daños al floema que caracteriza la infección por fitoplasmas (Franco-Lara y Filgueira, 2005). El grupo de fitoplasmas 16SrVII, también afectan plantas de los géneros *Fraxinus* y *Syringa* en Norte América produciendo una enfermedad llamada “Ash Yellows” y “Lilac Witches´-broom” que afecta las poblaciones de estos géneros (Sinclair *et al.*, 1996). En Suramérica, también se han reportado fitoplasmas del grupo VII en Brazil, en cultivos de alfalfa en Argentina (Conci *et al.*, 2005) y en Chile en las especies *Ugni molinae* y *Paeonia lactiflora* (Arismendi *et al.*, 2011). Hasta el momento, se desconoce la especie que actúa como vector de este grupo de fitoplasmas en las regiones de ocurrencia de esta enfermedad.

En Bogotá, los Urapanes son la tercera especie en abundancia del paisaje urbano con un estimado aproximado de 23.000 individuos (JBB, 2007) y hacen parte de los elementos constitutivos del espacio público (Decreto 1504 de 1998). Estudios en el grupo de investigación en Fitoplasmas y Virus de la Universidad Militar, demostraron la infección experimental con fitoplasmas de Urapán en plantas herbáceas como *Apium graveolens* (familia Apiaceae), *Nicotiana tabacum* y *N. debneyi* (Familia Solanaceae) (Perilla *et al.*, 2010). Más allá de demostrar que era posible infectar estas especies, se demostró que colocando estos hospederos en las ramas de árboles infectados con fitoplasmas era suficiente para transmitir fitoplasmas por lo que se concluyó que los insectos vectores eran capaces de alimentarse también de los hospederos alternativos y presentó la primera evidencia de que los insectos vectores eran polípagos (Perilla *et al.*, 2010).

Por otra parte, mediante observaciones de síntomas y detección por PCR anidada del gen 16S, secuenciación y RFLP del gen 16S, se detectaron infecciones mixtas de fitoplasmas del grupo 16SrVII y 16SrI en la especie *Liquidambar styraciflua* (familia Hamamelidaceae) que hace parte del arbolado urbano de Bogotá (Franco-Lara *et al.*, 2010).

En Colombia, se han publicado reportes de fitoplasmas del grupo 16SrIII en *Solanum quitoense* (Betancourt & Villamar, 2004) y *Coffea arabica* (Galvis *et al.*, 2007) y los grupos 16Sr-V y 16Sr-XII en *Solanum tuberosum* (Mejía *et al.*, 2011). Además, en la base de datos GenBank se encuentran reportadas secuencias de fitoplasmas encontradas en Colombia en hospederos como *Manihot esculenta* (grupo 16SrIII), *Elaeis guineensis* (Grupo 16SrI y grupo 16SrIII) y *Zea mays* (16SrI).

2.3 Mecanismos de Transmisión de Fitoplasmas

En condiciones naturales, la transmisión de los fitoplasmas se da principalmente por insectos vectores, por propagación vegetativa de material infectado y excepcionalmente, a través de semillas (Cordova *et al.*, 2003). También se pueden transmitir por conexiones vasculares entre dos plantas (injertos o plantas ectoparásitas como *Cuscuta* sp.).

La dispersión de fitoplasmas en un ecosistema está mediada por insectos hemípteros, los cuales juegan un papel en la determinación del nicho ecológico de un determinado fitoplasma (Lee *et al.*, 2000). Aproximadamente 200 especies de insectos han sido confirmadas como vectores de fitoplasmas, las cuales están en el Orden Hemiptera, principalmente en el suborden Auchenorrhyncha; en familias como Cicadellidae, Psyllidae, Cixiidae (Hill y Sinclair, 2000), Cercopidae, Delphacidae, Derbidae, Flatidae (Weintraub y Beanland, 2006), Pentatomidae (Mitchell, 2004) y Tingidae.

Entre los insectos Auchenorrhyncha, se conoce que el ciclo de vida consta de cinco instar ninfales, los huevos son puestos en tejidos vegetales, las generaciones por año son variables y en algunos casos el hábitat de ninfas y adultos puede ser diferente. En este grupo de insectos fitófagos, existen diferentes estrategias de alimentación, sobre los tejidos vegetales (xilema, floema o células del mesófilo). Entre los que se alimentan de la savia transportada en el floema se encuentran la mayoría de insectos en las familias Fulgoroidea, Cicadellidae y Membracidae (Wilson y Weintraub, 2007; Wilson y Turner, 2010).

En los insectos que se infectan con fitoplasmas, estos se ubican en diferentes órganos de los vectores como el intestino, la hemolinfa y las glándulas salivares (Weintraub y Beanland, 2006). Los fitoplasmas deben ser capaces de evadir el sistema inmune de los insectos y replicarse dentro de ellos. Las relaciones fitoplasmas-insectos pueden ser neutrales, disminuir o aumentar la idoneidad en el insecto respecto a su sobrevivencia o éxito reproductivo (Hogehout *et al.*, 2008). Entre las poblaciones de insectos que se alimentan del floema, se pueden diferenciar insectos portadores de fitoplasmas de los insectos transmisores de fitoplasmas. El proceso de transmisión de fitoplasmas requiere del reconocimiento a nivel celular y molecular de componentes entre los tejidos del insecto y el fitoplasma, no todos los insectos en los cuales se detecten fitoplasma tiene la habilidad de transmisión (Hogehout *et al.*, 2008).

En el proceso de transmisión mediada por vectores, se conoce como periodo de adquisición al momento en que un insecto libre de fitoplasmas se alimenta de una planta infectada (Weintraub y Beanland, 2006). Cuando un insecto fitófago especialista del floema, succiona la savia de una planta infectada con fitoplasmas, el insecto ingiere las bacterias. A continuación, si los fitoplasmas son capaces de replicarse al interior del insecto, sucede el periodo de latencia o incubación que corresponde al tiempo requerido antes que el insecto pueda inocular de forma efectiva una nueva planta (Tanne *et al.*,

2001). En este tiempo, los fitoplasmas se propagan a través del cuerpo del insecto, se retienen en la hemolinfa, se multiplican en la cavidad corporal y por último colonizan las glándulas salivares. Finalmente sucede la transmisión si el insecto vector inyecta posteriormente los fitoplasmas durante su alimentación en plantas sanas (Weintraub y Beanland, 2006; Tanne *et al.*, 2001).

Otros factores asociados al comportamiento de alimentación como la salivación, el tejido preferencial de alimentación, las habilidades sensoriales, la morfología bucal, el tamaño del estilete y de canales determinan que un insecto sea transmisor de fitoplasmas (Tanne *et al.*, 2001). Por esta razón sólo entre los grupos de insectos que no generan daño durante su alimentación se pueden encontrar vectores de fitoplasmas (Wilson y Weintraub, 2007), los cuales permanecen infectivos de por vida, haciendo que la transmisión sea persistente (Weintraub y Beanland, 2006; Tanne *et al.*, 2001).

Familia Cicadellidae en Colombia

De acuerdo con Dietrich (2005), la familia Cicadellidae hace parte de la superfamilia Membracoidea que a su vez se incluye en el infraorden Cicadomorpha. El infraorden Cicadomorpha es un grupo altamente diverso, en el cual hay controversia entre las relaciones entre los grupos superiores a familias y deficiencias de claves taxonómicas representativas. Sólo en Norteamérica se conocen aproximadamente 3000 especies y se estima que en los trópicos cerca del 90% de las especies no tienen registro (Dietrich, 2005).

La familia Cicadellidae está comprendida por 38 subfamilias y se han descrito aproximadamente 22000 especies a nivel mundial. Considerando que en el neotrópico la fauna ha sido poco estudiada Freytag y Sharkey (2002), estiman que puede haber entre 10000 y 15000 especies sin describir. En Colombia solo hay descritas 679 especies de cicadélidos, para las cuales en la mayoría de los casos no se conoce su hospedero vegetal (Freytag y Sharkey, 2002). Por lo tanto, son escasos los reportes de información taxonómica, de hábitat o ciclo de vida de especies de la familia Cicadellidae en Colombia. Por ejemplo, Vargas (2007) en una revisión de 780 especímenes del género *Soosiulus* depositados en colecciones entomológicas, reconoció 11 especies descritas y 14 especies nuevas (Vargas, 2007). El mencionado estudio sólo se centró en el género *Soosiulus*, a pesar de lo cual se encontró una alta diversidad morfológica de los especímenes y fue necesario proponer nuevos caracteres de identificación y discriminación adicionales a la descripción taxonómica del grupo (Vargas, 2007). Lo anterior evidencia una debilidad en el conocimiento de la biología básica de la fauna de potenciales vectores de fitoplasmas en Colombia.

2.4 Detección y Clasificación de Fitoplasmas

Detección de fitoplasmas

Teniendo en cuenta que desde la primera descripción de los fitoplasmas (1967) hasta 2012, no se conocía ningún método para generar cultivos puros de fitoplasmas, la taxonomía de fitoplasmas se soporta en caracteres moleculares, útiles en la detección y en la identificación de este grupo de bacterias. Por ello la detección sensible y precisa de los fitoplasmas tanto en hospederos vegetales como en insectos ha sido uno de los aspectos importantes en el conocimiento de estas bacterias, lo que es indispensable para el manejo o control de enfermedades asociadas con fitoplasmas. Los métodos usados para identificación o diferenciación de fitoplasmas han variado a lo largo del tiempo según el avance de las técnicas en Biología Molecular, la aparición de enfermedades causadas por fitoplasmas en nuevos hospederos y la nueva información adquirida sobre estos microorganismos.

En los primeros estudios sobre la identificación de fitoplasmas se usaron características biológicas como la especificidad de transmisión de los fitoplasmas mediada por vectores (Seemüller *et al.*, 1998), métodos serológicos, hibridación con sondas de ADN de fitoplasmas mediante 'Dot-Blot', RFLP y 'Southern blot' para análisis de patrones de bandeos y análisis RFLP de amplificaciones por PCR anidada de genes ribosomales (Smart *et al.*, 1996).

La información de secuencias del gen 16S rRNA disponibles en inicios de la década de los noventa permitió diseñar diferentes parejas de iniciadores para amplificar diferencialmente secuencias ribosomales de fitoplasmas (Lee *et al.*, 1993). También se consideró la región espaciadora 16S-23S rRNA (Smart *et al.*, 1996) para diseñar iniciadores considerados específicos; en conjunto, se usan diferentes combinaciones de iniciadores en rondas primarias y anidadas de PCR según los grupos de fitoplasmas (Gundersen y Lee, 1996). Para confirmar los resultados, los productos de PCR anidada, son analizados por RFLP y secuenciados para confirmar su origen (Wally *et al.*, 2008), y determinar el grupo al que pertenecen (Lee *et al.*, 2000; IRPCM 2004, Wei *et al.*, 2007). La técnica de PCR presenta limitaciones frente al diagnóstico reproducible de infecciones por fitoplasmas puesto que en algunas especies vegetales que tienen alto contenido de polifenoles, es difícil la obtención de ADN de buena calidad apropiado para aplicaciones como PCR (Gibb y Padovan, 1994), incluso en plantas con síntomas evidentes (Gaitán, 2003; Gutiérrez, 2006). Adicionalmente la segunda ronda de amplificación puede incrementar el riesgo de contaminación en análisis de rutina (Bertolini *et al.*, 2007), por lo cual es necesario incluir en todos los pasos controles negativos de agua y ADN que dan confiabilidad a los ensayos.

Por ello se han buscado alternativas metodológicas de detección e identificación de fitoplasmas por ejemplo ensayos de movilidad heteroduplex (HMA) de la región espaciadora 16S/23S (Wang & Hiruki, 2005), o PCR co-operacional asociada con 'dot blot' (Co-PCR) en la cual se emplean tres iniciadores considerados universales para los grupos de fitoplasmas en una sola reacción, uno externo y dos que anillan sobre el amplificado producido por el primer iniciador (Bertolini *et al.*, 2007). Por su bajo costo este método fue evaluado para detectar fitoplasmas en *L. styraciflua*, árboles de ornato en Bogotá, y no representó una mejora respecto al uso de PCR anidada en la detección específica de secuencias de fitoplasmas (Franco-Lara *et al.*, 2010).

También se ha usado la técnica T-RFLP (Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción terminal), como método directo para producir perfiles de RFLP amplificando genes rRNA, que generan un patrón de bandeo fluorescente en electroforesis de alta definición en un secuenciador automatizado (Hodgetts *et al.*, 2007). Otras técnicas basadas en amplificaciones isotérmicas (LAMP) se han evaluado para la detección específica de fitoplasmas de los grupos 16Srl, 16Sr-XXII (Tomlinson *et al.*, 2010), 16SrlI y 16Sr-XII (Bekele *et al.*, 2011) en una sola ronda de amplificación con la misma sensibilidad que el uso de PCR anidada. Alternativamente, los sistemas de PCR en tiempo real (RT-PCR) han permitido un aumento en la sensibilidad, confiabilidad y reproducibilidad respecto a la PCR anidada estándar, permitiendo la detección de fitoplasmas en muestras negativas por otros métodos y evitando posteriores modificaciones post-PCR (Chistiensen *et al.*, 2004; Galetto *et al.*, 2005).

A pesar de diferentes posibilidades metodológicas, en el diagnóstico e identificación rutinaria de fitoplasmas el método más usado es PCR anidada de un segmento del gen 16S rRNA seguido por RFLP con enzimas de restricción según el grupo (Lee *et al.* 1998) o la secuenciación de los amplicones obtenidos. Este segundo paso después de la amplificación por PCR anidada es indispensable para confirmar que los amplicones son fitoplasmas y no se presentan detecciones inespecíficas de otras bacterias endófitas o ADN ribosomal de cloroplastos (Wally *et al.*, 2008). Además, con la disponibilidad de herramientas bioinformáticas, es posible realizar análisis RFLP *in silico* con las cepas representativas de cada grupo (Wei *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2009).

Clasificación taxonómica

De forma similar a la identificación, las primeras aproximaciones para diferenciar fitoplasmas se basaron en los síntomas inducidos a la planta hospedera, la especie en la que se describía la enfermedad y el rango geográfico de ocurrencia de la enfermedad (Lee *et al.*, 2000), pero esos criterios no necesariamente implicaban una relación entre los diferentes grupos de fitoplasmas.

Es concordancia con la tendencia para la identificación de bacterias en general, la clasificación taxonómica de los fitoplasmas se hace a partir de las secuencias 16S rRNA. A partir de la información de secuencias generada para este gen en fitoplasmas, se han realizado análisis filogenéticos (Lee *et al.*, 1998, Wei *et al.*, 2007), permitiendo el establecimiento de un sistema de clasificación basado en el análisis RFLP de regiones amplificadas por PCR del gen 16S rRNA (Grupos 16Sr), el cual sigue siendo una forma confiable y rápida de diferenciación e identificación entre fitoplasmas conocidos. Los grupos de fitoplasmas se basan en los perfiles generados por restricción con 17 enzimas de corte frecuente entre las que se encuentran *AluI*, *RsaI*, *MseI* o *HinfI* (Semüller *et al.*, 1998; Wei *et al.*, 2007). Estos perfiles han permitido identificar 32 grupos 16Sr (Tabla 2-1) y más de 100 subgrupos.

Desde el punto de vista taxonómico formal, cada grupo filogenético de fitoplasmas representa una especie de fitoplasmas. La descripción del taxón '*Candidatus (Ca.) Phytoplasma*' como género y los lineamientos para definir una nueva especie fueron dados por el equipo de trabajo en fitoplasmas/espiroplasmas del IRPCM- Grupo de taxonomía de fitoplasmas (IRPCM) en el 2004. Bajo estos criterios, dos muestras se consideran especies diferentes cuando hay menos de 97.5% de similitud en una secuencia (>1200 bp) del gen 16S rRNA que comprende las primeras 1400 posiciones desde el extremo 5' del gen 16S rRNA (IRPCM 2004). Por la naturaleza altamente conservada del gen 16S rRNA pueden encontrarse especies diferentes, con distintas propiedades biológicas, fitopatológicas y genéticas, que tienen similitudes superiores al 97.5% para el gen 16S rRNA. En estos casos se requiere información adicional sobre los vectores, la especificidad de hospedero o marcadores moleculares adicionales para diferenciar dentro de cada taxón, los subgrupos de fitoplasmas (IRPCM, 2004; Duduk y Bertaccini, 2011).

La diversidad entre cepas de fitoplasmas de un mismo grupo es alta y para realizar estudios epidemiológicos dirigidos al control de las enfermedades causadas por fitoplasmas se deben identificar los fitoplasmas al interior de los grupos filogenéticos (Duduk y Bertaccini, 2011). Por ello, el esquema de clasificación que parte del gen 16S rRNA se ha refinado incluyendo otras regiones genómicas que aportan información adicional como los genes 23SrRNA y la región intergénica espaciadora 16S- 23SrRNA (Hodgets *et al.*, 2009), el gen *tuf* (factor de elongación EF-Tu), proteínas ribosomales *rpsV*(*rpl22*), *rpsC* (*rps3*) (Martini *et al.*, 2007), subunidades de proteínas translocasas como *secY* (Lee *et al.*, 2006) y *secA* (Hodgetts *et al.*, 2008) y más recientemente, genes que codifican para proteínas membranales como *map*, *degV* (Arnaud *et al.*, 2007), *nus* y *groEL* (Mitrovic *et al.*, 2011). Recientemente, con la información de múltiples genes que representan mejor la variabilidad, se han realizado análisis de secuencias multilocus (MLST) para entender la diversidad genética de fitoplasmas relacionados, pero con diferentes características ecológicas o patológicas (Duduk y Bertaccini, 2011; Marcone, 2012).

Tabla 2-1. Grupos 16Sr de Fitoplasmas (Zhao *et al.*, 2010; Martini *et al.*, 2012, Davis *et al.*, 2012; Win *et al.*, 2013; Nejat *et al.*, 2013)

Grupo		Sub-grupos	Número de especies 'Ca phytoplasma'
16SrI	<i>Aster yellows</i>	11	1 'Ca Phytoplasma asteris'
16SrII	<i>Peanut witches'-broom</i>	12	2 'Ca Phytoplasma aurantifolia' y 'Ca Phytoplasma australasiae'
16SrIII	<i>X-disease</i>	19	2 'Ca Phytoplasma pruni' y 'Ca Phytoplasma sudamericanum'
16SrIV	<i>Coconut lethal yellows</i>	6	1 'Ca Phytoplasma palmae'
16SrV	<i>Elm yellows</i>	6	4 'Ca Phytoplasma ulmi', 'Ca Phytoplasma ziziphi', 'Ca Phytoplasma vitis' y 'Ca Phytoplasma balanitae'
16SrVI	<i>Clover proliferation</i>	8	1 'Ca Phytoplasma trifolii'
16SrVII	<i>Ash yellows</i>	3	1 'Ca Phytoplasma fraxini'
16SrVIII	<i>Loofah witches'-broom</i>	1	1 'Ca Phytoplasma luffae'
16SrIX	<i>Pigeon pea witches'-broom</i>	4	1 'Ca Phytoplasma phoenicium'
16SrX	<i>Apple proliferation</i>	5	4 'Ca Phytoplasma mali', 'Ca Phytoplasma pyri', 'Ca Phytoplasma trifolii', 'Ca Phytoplasma prunorum' y 'Ca Phytoplasma spartii'
16SrXI	<i>Rice yellow dwarf</i>	3	1 'Ca Phytoplasma oryzae'
16SrXII	<i>Stolbur</i>	7	4 'Ca Phytoplasma australiense', 'Ca Phytoplasma japonicum', 'Ca Phytoplasma fragariae' y 'Ca Phytoplasma solani'
16SrXIII	<i>Mexican periwinkle virescence</i>	2	1
16SrXIV	<i>Bermudagrass white leaf</i>	1	1 'Ca Phytoplasma cynodontis'
16SrXV	<i>Hibiscus witches'-broom</i>	1	1 'Ca Phytoplasma brasiliense'
16SrXVI	<i>Sugarcane yellow leaf syndrome</i>	1	1 'Ca Phytoplasma graminis'
16SrXVII	<i>Papaya bunchy top</i>	1	1 'Ca Phytoplasma caricae'
16SrXVIII	<i>American potato purple top wilt</i>	1	1 'Ca Phytoplasma americanum'
16SrXIX	<i>Japanese chesnut witches'-broom</i>	1	1 'Ca Phytoplasma castaneae'
16SrXX	<i>Buckthorn witches'-broom</i>	1	1 'Ca Phytoplasma rhamnii'
16SrXXI	<i>Pine shoot proliferation</i>	1	1 'Ca Phytoplasma pini'
16SrXXII	<i>Nigerian coconut lethal decline (LDN)</i>	1	1 'Ca Phytoplasma cocosnigeriae'
16SrXXIII	<i>Buckland Valley grapevine yellows</i>	1	1
16SrXXIV	<i>Sorghum bunchy shoot</i>	1	1
16SrXXV	<i>Weeping tea tree witches'-broom</i>	1	1
16SrXXVI	<i>Mauritius sugarcane yellows D3T1</i>	1	1
16SrXXVII	<i>Mauritius sugarcane yellows D3T2</i>	1	1
16SrXXVIII	<i>Havana derbid phytoplasma group</i>	1	1
16SrXXIX	<i>Cassia witches'-broom</i>	1	1 'Ca Phytoplasma omanense'
16SrXXX	<i>Salt cedar witches'-broom</i>	1	1 'Ca Phytoplasma tamaricis'
16SrXXXI	<i>Bindweed yellows (BY)</i>	1	1 'Ca. Phytoplasma convolvuli'
16SrXXXII	<i>Malaysian periwinkle virescence (MaPV)</i>	3	1 'Ca Phytoplasma malaysianum'

2.5 Genoma de Fitoplasmas

Actualmente se encuentran disponibles las secuencias anotadas de los genomas completos de cuatro fitoplasmas. ‘*Candidatus phytoplasma asteris*’ cepa “Onion yellows” y cepa “Aster yellows” y “*Ca. P. australiense*” poseen genomas circulares (Oshima *et al.*, 2004; Bai *et al.*, 2006; Kube *et al.*, 2008), mientras que el genoma de ‘*Ca. P. mali*’ es lineal (Tran-Nguyen *et al.*, 2008). También está disponible la anotación del genoma parcial del fitoplasma Peanut Witches’-Broom, con una cobertura del 90% y 13 contigs ensamblados (Chung *et al.*, 2013). En general los fitoplasmas tienen genomas pequeños con cromosomas entre 530 a 1350 Kpb (Marccone *et al.*, 1999) y entre 481 a 776 genes codificantes para proteínas (Hogenhout *et al.*, 2008, Kube *et al.*, 2012). Sus genomas son ricos en AT pues, su contenido (G+C) está entre 21,4 y 29%. Pueden o no presentar ADN extra cromosómico, en algunos fitoplasmas se han reportado hasta cuatro plásmidos variables en tamaño, desde 3800 pb hasta 5100 pb (Bai *et al.*, 2006). Los fitoplasmas tienen dos operones de rRNA, una región tRNA ile en la región espaciadora de los genes 16S y 23S y usan UGA como codón de parada (IRPCM 2004). Aproximadamente entre el 35% al 53% de los genes codificantes de los genomas de fitoplasmas aún no tienen una función conocida (Tran-Nguyen *et al.*, 2008; Chung *et al.*, 2013).

La disponibilidad de sólo cuatro genomas completos, se debe en parte a la dificultad para obtener fracciones de ADN purificadas y enriquecidas a partir de hospederos vegetales, con técnicas como electroforesis de campo pulsado (PFGE) o repetidas rondas de ultra centrifugación con cloruro de cesio-bisbenzimidaz. A pesar de que estas técnicas han permitido la construcción de librerías genómicas para su posterior secuenciación por la técnica ‘*shotgun*’ (Tran-Nguyen y Gibbs, 2007; Kube *et al.*, 2012), se ha encontrado baja cobertura de los clones recombinantes y de las secuencias de las regiones ricas en AT, y baja calidad en las secuencias (Kube *et al.*, 2012). Adicionalmente se presentan limitaciones en el proceso de ensamblaje de estos genomas ricos en repeticiones porque las librerías obtenidas muestran un sesgo en la clonación de fragmentos, pero se espera que la disminución de costos de secuenciación y la aplicación de técnicas de secuenciación de alta resolución y cobertura que no impliquen la clonación del ADN genómico, permitan la secuenciación de un mayor número de genomas completos de estas fitoplasmas (Kube *et al.*, 2012).

El análisis de información genómica y proteómica ha mostrado que los fitoplasmas presentan reducciones del genoma con ausencia de las rutas de síntesis de varios aminoácidos, ácidos grasos y nucleótidos (Oshima *et al.*, 2004). A diferencia de otros

Mollicutes, carecen de componentes en la producción de ATP mediada por ATP sintasas tipo F_0F_1 , de sistemas fosfotransferasas PST, entre otros, lo cual representa posibles escenarios interesantes para entender el funcionamiento metabólico de los fitoplasmas (Ji *et al.*, 2010; Kube *et al.*, 2012).

El genoma de fitoplasmas codifica una alta proporción de proteínas de sistemas de transporte, de anclaje a membrana y proteínas en contacto con el citoplasma de la célula que infectan (Hogenhout *et al.*, 2008). Los fitoplasmas tienen un gran número de sistemas de proteínas de transporte, comparado con el tamaño de su genoma, entre las que se incluyen permeasas, proteínas de unión a solutos del sistema transportador ABC para péptidos, aminoácidos, iones inorgánicos como cobalto, manganeso y zinc y también codifican transportadores de maltosa, tetralosa, sucrosa y palatinosa (Christensen *et al.*, 2005) con los que toman compuestos esenciales de su hospedante (Kube *et al.*, 2012). Se considera que las células parasíticas de los fitoplasmas adaptan su potencial hídrico a condiciones isotónicas del huésped con canales de membrana y transportadores para contrarrestar la pérdida osmótica de agua (Christensen *et al.*, 2005). Los fitoplasmas también tienen un sistema de secreción Sec-dependiente para liberar proteínas maduras al ambiente extracelular; los sustratos del sistema Sec tienen un péptido señal en el extremo N-terminal, el cual es reconocido cuando se transcribe la proteína (Kakizawa *et al.*, 2004). Se cree que las proteínas secretadas y ancladas a la membranas de los fitoplasmas podrían actuar como factores de virulencia similar a adhesinas, proteasas o enzimas hidrolíticas; importantes en la interacción de los fitoplasmas con sus hospederos (Hogenhout y Loria, 2008).

A pesar de tener genomas condensados con juego mínimo de rutas metabólicas (Oshima *et al.*, 2002), poseen repeticiones de *clusters* de genes con características de elementos genéticos móviles (PMU's) (Bai *et al.*, 2006; Hogenhout *et al.*, 2008). Se cree que esos segmentos asociados a transferencia horizontal pueden estar relacionados con adaptación de los fitoplasmas a los ambientes intracelulares de vegetales y de insectos (Bai *et al.*, 2006; Hogenhout *et al.*, 2008; Sugio y Hogenhout, 2012). En las regiones PMU's o similares a PMU's, se encuentran la mayoría de genes que codifican pequeñas proteínas potenciales efectores, o moléculas secretadas por los fitoplasmas para facilitar su multiplicación y dispersión (Sugio *et al.*, 2011; Sugio y Hogenhout, 2012). La mayoría de potenciales efectores, además de carecer de similaridad de secuencias con genes codificantes de proteínas conocidas, parecen ser específicos por especies o cepas de fitoplasmas, lo cual indica que estos efectores tienden a evolucionar más rápido que otros genes en los genomas de los fitoplasmas y probablemente sean importantes en la adaptación a diferentes hospederos (Chung *et al.*, 2013).

Interacción Hospedero- Patógeno

Existe poca información sobre los mecanismos de patogenicidad de los fitoplasmas y cómo logran generar los síntomas observados en las plantas. En general se han descrito cambios bioquímicos entre las plantas infectadas con fitoplasmas y las que están libres de estos microorganismos. Entre ellas está el bloqueo en el transporte a través del floema, cambios en la translocación de fotosintatos, reducción en la tasa fotosintética, alteración del metabolismo secundario y perturbación del balance hormonal de las plantas (Christensen *et al.*, 2005).

En plantas infectadas con fitoplasmas se han estudiado los cambios en los niveles endógenos de reguladores de crecimiento y según la especie vegetal y los órganos de la planta los cambios son diferentes. Por ejemplo en *C. roseus* infectadas la concentración de citoquininas en flores con filodia es mayor que en plantas sanas, mientras que la concentración de la misma hormona en raíces y hojas maduras se presenta por debajo de los niveles normales (Marcone, 2010). En otros casos se han estudiado los cambios en la expresión de genes de plantas infectadas, por ejemplo, en plantas de tomate se encontró que la infección con el fitoplasma stolbur (Grupo 16SrXII), induce la represión de los genes vegetales *LeWUSCHEL* y *LeCLAVATA1* involucrados en el desarrollo de meristemos y *LeDEFICIENS* en la identidad de órganos y a su vez, la sobreexpresión del gen *FALSIFLORA*, que controla la identidad del meristemo floral (Pracros *et al.*, 2007).

A partir de la información genómica recientemente se han asociado algunos síntomas observados en plantas infectadas por fitoplasmas con las proteínas secretadas al citoplasma del huésped, que pueden actuar directamente con los componentes celulares del huésped o atravesar los plasmodesmos (cuando son inferiores a 40 kDa) y actuar como factores de virulencia en tejidos sumidero (Hogenhout y Loria, 2008). En el genoma de "*Ca. phytoplasma asteris*" se encontraron 4 proteínas que son secretadas directamente al citoplasma de la célula eucariota con señales de localización nuclear: SAP11 (14 kDa), SAP22 (84 kDa), SAP30 (12 kDa), y SAP42 (9 kDa). Entre ellas, SAP11 está codificada en una región potencialmente móvil (PMU), que podría asemejarse a una isla de patogenicidad y constituye un potencial efector de la alteración de la fisiología de la célula de la planta (Bai *et al.*, 2009; Sugio *et al.*, 2011). Ello tiene congruencia con la identificación del sistema de transporte de proteínas de la vía Sec y secuencias de proteínas con péptido señal N-terminal, en los genomas de los fitoplasmas, sugiriendo la funcionalidad de este sistema (Bai *et al.*, 2009). La acción de productos metabólicos a larga distancia se planteó al evaluar infecciones con fitoplasmas del grupo 16SrIV (LY de palma de coco), 16SrXI "*rice yellow dwarf*" y 16SrXVII "*australian papaya dieback*" pues no existe relación entre la presencia de los fitoplasmas en determinados órganos de la planta con las alteraciones y los síntomas, lo que puede ser causado por un metabolito

tóxico de los fitoplasmas (Siddique *et al.*, 1998). En la cepa OY de “*Ca. P. asteris*” se evaluó la función de una proteína fitoplásmica de 4.5 kDa (TENGU) expresándola en *Arabidopsis thaliana* y se encontró que su efecto es la supresión de la respuesta a auxinas de la planta, lo que induce morfología anormal como escobas de bruja y enanismo (Hoshi *et al.*, 2009). En el caso de la proteína TENGU se pudo establecer el efecto de un metabolito transportado por los haces vasculares hacia los tejidos sumidero (Hoshi *et al.*, 2009). Se conoce que una de las proteínas codificadas en el genoma del fitoplasma AY-WB (Grupo 16SrI), de 10.7 kDa (SAP54), que es secretada en el floema de las plantas infectadas, genera malformaciones florales y la pérdida de la determinación del meristemo floral en líneas transgénicas estables de *Arabidopsis thaliana*. Estas flores anormales asemejan los síntomas producidos por el fitoplasma AY-WB (MacLean *et al.*, 2011).

Además del efecto de las proteínas translocadas, otras proteínas de fitoplasmas son candidatas de la interacción con su hospedero. Hasta el momento no existen reportes de secuencias de los genes *SecA*, *Imp*, *Amp* o *IdpA* del fitoplasma ‘*Candidatus* fitoplasma’ *fraxini* (grupo 16SrVII). Los genes *Imp*, *Amp* e *IdpA* codifican para proteínas IDPs (en inglés *Immunodominant membrane proteins*) de fitoplasmas, la cuales son proteínas inmunodominantes de membrana y son de interés porque parecen estar relacionadas con interacciones proteína-proteína con los insectos que transmiten fitoplasmas. *Amp* interactúa con los componentes protéicos de los microfilamentos de cicadélidos vectores del fitoplasma *Onion Yellows* (Grupo 16SrI), lo cual probablemente está relacionado con la capacidad de transmisión de los insectos (Suzuki *et al.*, 2006). Las proteínas IDPs carecen de homología con secuencias de otros organismos. Constituyen la mayor proporción del total de proteínas de membrana, se localizan en diferentes regiones del genoma y entre ellas muestran una alta variación antigénica y en composición de aminoácidos (Kakizawa *et al.*, 2009).

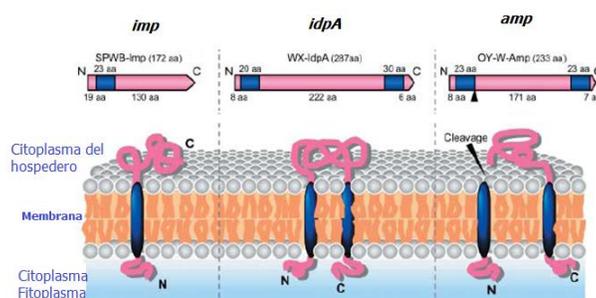


Figura 2-1. Representación diagramática de los genes IDP de fitoplasmas (Tomado de Hogenhout *et al.*, 2008).

Se han encontrado tres tipos de IDPs en diferentes fitoplasmas (*Imp*, *IdpA*, *Amp*) (Tabla 2-2), se cree que tienen un papel en unión a la membrana celular del hospedero (Hogenhout *et al.*, 2008) y se han relacionado con la capacidad de transmisión de los fitoplasmas por los insectos vectores (Suzuki *et al.*, 2006). Todos los genes IDPs

codifican una región hidrofílica central posiblemente extracelular y varían en el anclaje transmembranal hidrofóbico (figura 2-1). *Imp* tiene una región N-terminal transmembranal y se considera que los genes *Imp* son conservados entre todos los fitoplasmas (Kakizawa *et al.*, 2009). *IdpA* tiene dos regiones transmembranales en cada extremo N-terminal y C-terminal que permanecen sin ser cortadas. *Amp* por su parte, tiene un segmento N-terminal transmembranal el cuál es cortado y se ancla a la membrana por el extremo C-terminal (Barbara *et al.*, 2002).

Otros posibles factores de virulencia están presentes en el genoma de los fitoplasmas, pero su acción en la planta aún no se ha esclarecido y su función es hipotética, por ejemplo, hemolisinas (*hlyC* y *tlyC*), que actuarían como agentes de daño de membrana, metaloproteasas dependientes de ATP (*hflB* o *ftsH*) ancladas a la membrana de fitoplasmas y nucleasas (Hogenhout *et al.*, 2008).

Tabla 2-2. Fitoplasmas en los que se han descrito secuencias de genes de proteínas inmunodominantes.

Gen IDP	Fitoplasma	Grupo 16S rRNA	Accesión Gen Bank	Referencia
<i>Imp</i>	Sweet potato witches' broom (SPWB)	16Sr-VI	U15224	Yu <i>et al.</i> , 1998
	Apple proliferation (AP)	16Sr-X	AJ011678	Berg <i>et al.</i> , 1999
	Australian grapevine yellows (AUSGY)	16Sr-XII	CAM12096	Tran-Nguyen <i>et al.</i> , 2008
	Western X-disease (WX)	16SrIII		Liefting y Kirkpatrick <i>et al.</i> , 2003
	European stone fruit yellows (ESFY)	16Sr-X	AF400587	Morton <i>et al.</i> , 2003
	Peach yellow leaf roll (PYLR)	16SrIII	AF400589	
	Pear decline (PD)	16Sr-X	AF400588	
	Onion yellows (OY)	16Srl	AB469007 AB469008	Kakizawa <i>et al.</i> , 2009
	Mulberry Dwarf (MD)	16Srl	AB469009	
	Paulownia witches' broom (PaWB)	16Srl	AB469010	
	Porcelain vine witches' broom (PvWB)	16Srl	AB469011	
	Tsuwabuki witches' broom (TWB)	16SrIII	AB469012	
	Rice yellows dwarf (RYD)	16Sr-XI	AB469013	
Potato witches' broom Korea (PWBK)	16Sr-VI	AB469014		
<i>IdpA</i>	Western X (WX)	16SrIII	AF533231	Blomquist <i>et al.</i> , 2001
<i>Amp</i>	Aster yellows (AY)	16Srl	AF244540	Barbara <i>et al.</i> , 2002
	Clover phyllody (CPh)	16Srl	AF244541	
	Onion Yellows (OY)	16Srl	AB124806	Kakizawa <i>et al.</i> , 2004

3. HIPÓTESIS EXPERIMENTAL

Las enfermedades de árboles asociadas con fitoplasmas en Bogotá son recientes, las primeras observaciones fueron para *F. uhdei* a mediados de la década de 1990. En los árboles de *F. uhdei*, se reportaron por primera vez fitoplasmas del grupo 16SrVII a mediados de la década del 2000 (Griffiths *et al.*, 2001; Gaitán, 2003; Filgueira *et al.*, 2004) y posteriormente en los árboles de *L. styraciflua* en 2007 se empezaron a observar cambios de la morfología de la planta, en los cuales posteriormente se detectó por RFLP la infección mixta de fitoplasmas de los grupos 16SrVII y 16Srl (Franco-Lara *et al.*, 2010). Teniendo en cuenta el valor ambiental, ornamental y económico del arbolado urbano, sumado al potencial riesgo epidemiológico de dispersión de fitoplasmas a plantas de valor comercial cultivadas en la Sabana de Bogotá y considerando que no existen métodos efectivos de control, se plantea la necesidad de conocer los insectos vectores responsables de la dispersión de los fitoplasmas en el área de Bogotá. Ello contribuye al conocimiento epidemiológico de la enfermedad y es requisito indispensable para proponer estrategias de manejo de la enfermedad a mediano plazo.

Por eso se plantearon dos hipótesis experimentales:

- 1) Si los insectos de la familia Cicadellidae son portadores de fitoplasmas, entonces entre ellos, se encontrarán los posibles vectores de fitoplasmas.
- 2) Si existen árboles en Bogotá de especies diferentes a *F. uhdei* y *L. styraciflua* con síntomas de fitoplasmosis, entonces estas especies podrían estar infectadas con fitoplasmas de los mismos grupos reportados para *F. uhdei* y *L. styraciflua*.

4.OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Contribuir al conocimiento de aspectos epidemiológicos de las fitoplasmosis de los árboles de Bogotá mediante la evaluación de la capacidad de transmisión de fitoplasmas de dos morfoespecies de Cicadellidae (Hemiptera, Auchenorrhyncha) de Bogotá.

4.2 Objetivos específicos

- Determinar la presencia de fitoplasmas en insectos cicadélidos capturados en Bogotá.
- Evaluar la capacidad de transmisión en condiciones experimentales de insectos portadores de fitoplasmas.
- Evaluar la infección de fitoplasmas en tres especies de árboles que circundan *Fraxinus uhdei* afectados por fitoplasmosis.
- Detectar la presencia de genes que codifican proteínas inmunodominantes de membrana con importancia potencial en la interacción hospedero-patógeno de fitoplasmas.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Localización de zona de estudio

Este estudio se llevó a cabo en la ciudad de Bogotá D. C., Colombia, con ubicación aproximada Latitud Norte 4°35'56"57 y Longitud Oeste 74°04'51"30, a una altitud promedio de 2.630 m.s.n.m. y con un área aproximada de 1587 Km². Teniendo en cuenta el diagnóstico de sintomatología asociada con fitoplasmas en *Fraxinus uhdei* realizado por Gaitán (2003) y Gutiérrez (2006), se definieron 2 áreas de estudio para este trabajo. En estas áreas urbanas, además de individuos de *F. uhdei* sintomáticos, se encuentran árboles de mediano porte como *Croton* spp., *Pittosporum undulatum*, *Populus nigra* entre otros. Las dos áreas son de acceso público y entre los árboles hay la presencia de pastizales. En estos pastizales se hicieron nueve muestreos para la colecta de cicadélidos posibles vectores de fitoplasmas entre Mayo del 2011 a Febrero del 2012, normalmente en horas de 9 am a 2 pm.

Los sitios de muestreo se presentan en los mapas del anexo A. El área 1 fue en la Localidad Teusaquillo en sitios como el Campus de la Universidad Nacional de Colombia, la Calle 53 y el Park Way. El área No. 2 fue en la Localidad Chicó en sitios como la Autopista norte entre calles 104 a 106, la Avenida Novena con calle 95 y la carrera 19 con calle 104.

5.2 Obtención de material biológico

5.2.1. Muestreo de Insectos

En las áreas definidas se realizaron muestreos capturando insectos saltadores por jameo con red entomológica. Los insectos capturados se transportaron al laboratorio de Biotecnología Vegetal de la UMNG, en donde se realizaron observaciones de los individuos utilizando un estereomicroscopio (Leica). Los insectos se agruparon según su apariencia, tamaño y características morfológicas como coloración del abdomen, alas y cabeza en diferentes morfoespecies. La observación de características morfológicas se realizó teniendo en cuenta las ilustraciones de Dietrich (2005) (figura 5-1) y con asesoría del Dr. Mike Wilson (Museo de Historia Natural de Gales, Reino Unido). De cada morfoespecie Los insectos que se usaron para extracciones de ADN se almacenaron a -70°C en ultra congelador (Revco). Los insectos utilizados en los ensayos de transmisión

se mantuvieron vivos en un frasco plástico de 50ml, con hojas de pasto fresco recogidas en el lugar de muestreo.

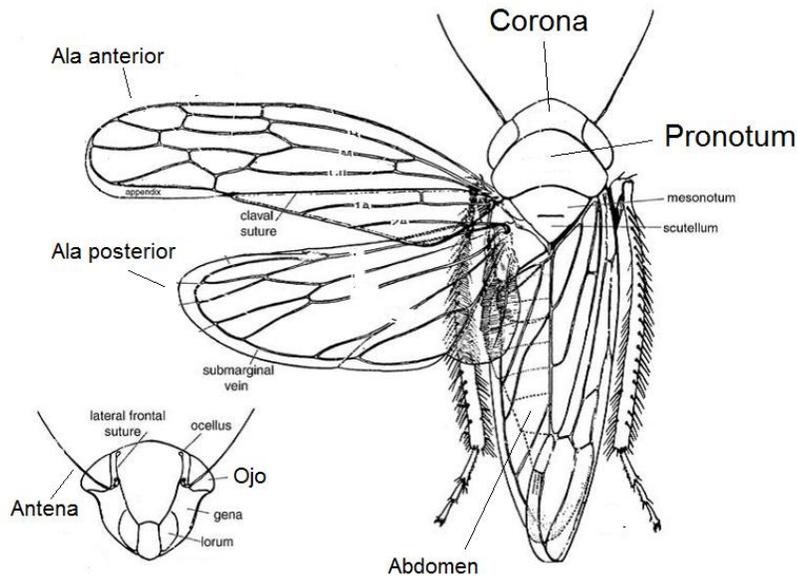


Figura 5-1. Principales partes en la morfología externa de la familia Cicadellidae. Tomado de Dietrich (2005).

5.2.2 Muestreo de árboles aledaños a *Fraxinus uhdei*:

En las mismas áreas de muestreo de insectos se cortaron ramas jóvenes de árboles de las especies *Croton* spp., *P. undulatum* y *P. nigra* aledaños a *F. uhdei*, usando una desgarradera y tijeras de jardinería. Las ramas se trasladaron a la UMNG. En el laboratorio las hojas y ramas se limpiaron superficialmente con agua y jabón, posteriormente se desinfectaron superficialmente con etanol al 70%. Mediante una delicada disección, el tejido fresco correspondiente a los haces vasculares se separó de la médula y la corteza (figura 5-2) y se almacenó a -70°C en un ultracongelador (Revco) hasta el momento de la extracción de ADN.

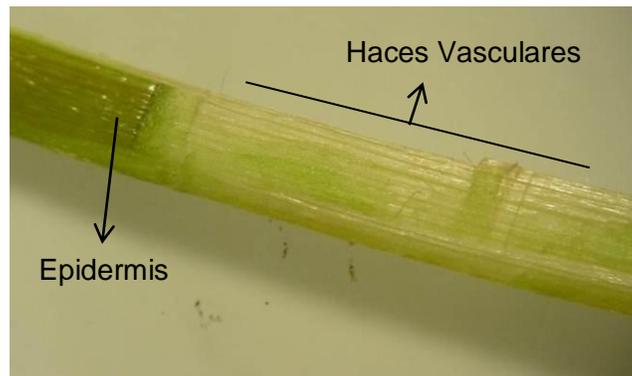


Figura 5-2. Separación de haces vasculares en tallos de *F. uhdei*.

5.3 Detección de Fitoplasmas

5.3.1 Extracción de ADN total de morfoespecies de cicadélidos

La extracción de ADN se hizo de acuerdo a Hung *et al.* (2004). Un individuo o grupos de máximo 5 insectos de la misma morfoespecie se pulverizaron en microtubos de 1,5 ml, luego de ser enfriados con nitrógeno líquido. Posteriormente se maceró con 30 μ L de buffer de lisis (10mM Tris-HCl pH 7,5, 100mM EDTA pH 7,5) y el macerado se llevó a volumen final de 800 μ L con el mismo buffer de lisis y se incubó a 55°C mínimo por 4 horas o toda la noche. Después se agregaron 500 μ L de fenol equilibrado y se separó centrifugando a 13000xg por 10 min. Los ácidos nucleicos de la fase acuosa se precipitaron con etanol absoluto durante 15 minutos a -20°C, posteriormente se centrifugaron por 25 min a 13000xg y el pellet se lavó con etanol al 70%. Luego de evaporar el etanol, el ADN total de insectos se resuspendió en buffer TE (Tris-HCl 10 mM, 1 mM EDTA) el ADN se almacenó a -20°C.

5.3.2 Extracción de ADN total vegetal

Se utilizó un método de extracción de ADN modificado por la Dra. Bertaccini (Dista, Universidad de Bologna). Un gramo de tejido proveniente de los haces vasculares se maceró en nitrógeno líquido con buffer de extracción I ($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 92mM, KH_2PO_4 30 mM, sacarosa 10%, BSA, PVP-10 5%, ácido L-ascórbico pH 7.6). El pellet se resuspendió en 4 ml de buffer de extracción II (Tris-HCl 100 mM, 100 mM EDTA, 250 mM NaCl), 80 μ L de proteinasa K (5 mg/ml) y 440 μ L de n-Lauroilsarcosina 10%, por 2 h a 55°C. El lisado se centrifugó 10 min a 8000xg (Eppendorf Rotor rotor F-34-6-38), descartando el pellet. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se agregaron 0.6V de isopropanol, se almacenó durante 30 min a -20°C. Posteriormente se centrifugó 15 min a 8000xg y el pellet se resuspendió en 3 ml de buffer TE, agregando 75 μ L de SDS 20% y 60 μ L de proteinasa K esta lisis se realizó por 1h a 37°C. Luego se adicionaron 525 μ L de NaCl 5M y 420 μ L de CTAB/NaCl (10% CTAB, 0.7M NaCl), incubando a 65°C por 10 min. Posteriormente se hizo una extracción orgánica con un volumen igual de Cloroformo/alcohol isoamil (24:1), se separó la fase orgánica centrifugando a 7500xg por 10 min. La fase acuosa se transfirió a tubos nuevos y se agregó un volumen igual de cloroformo, la emulsión se centrifugó a 7500xg por 10 min y la fase se precipitó con 0.6V de isopropanol durante toda la noche. Los ácidos nucleicos se centrifugaron a 11000xg (Eppendorf 5424) y el pellet se lavó con etanol al 70%. El pellet se resuspendió en buffer TE y el ADN se almacenó a -20°C.

5.3.2.1 Re-extracción de ADN genómico vegetal.

En algunos casos donde se sospechó de la presencia de inhibidores que co-precipitan con el ADN como compuestos fenólicos y carbohidratos de alto peso molecular, fue necesario un paso adicional de extracción con el Kit 'DNA Clean-Up' (MoBio), siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

5.3.3 Cuantificación de ADN genómico

Se usaron 2 μ L de todos los extractos de ADN total obtenido de plantas y de insectos, para evaluar cualitativamente la calidad y la concentración del extracto, en electroforesis en gel de agarosa (Bioline) al 1%. La electroforesis se corrió utilizando como buffer TBE 1X (89mM Tris base, 89mM ácido bórico, 2 mM EDTA), por 1 hora a 50 V en un equipo de la marca Major Science. La tinción de ADN se realizó con bromuro de etidio (Sigma) concentración final 0.5mg/ml y la visualización del gel se realizó en transiluminador UV. Algunas muestras de ADN se cuantificaron con el Kit Qubit Assay, utilizando un fluorímetro Qubit (Invitrogen ahora Life Technologies), siguiendo las instrucciones del fabricante.

5.3.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Con el objetivo de verificar la ausencia de sustancias inhibidoras en los extractos de ADN vegetal, estos se usaron como moldes en una reacción de PCR con los iniciadores rpsF (5'- GTGGTAGAAAGCAACGTGCGACTT -3') y rpsR2 (5'- TGCGGATCGAACATCAATTGCAAC -3') (Oxelman *et al.*, 1997), los que amplifican el intrón rps16 en el genoma de cloroplasto presente en todas las especies de plantas, generando un producto aproximado de 800pb. Cuando no hubo amplificación con este juego de iniciadores, se realizó un paso de purificación adicional del ADN total (numeral 5.3.2.1). Las condiciones de reacción y de amplificación fueron las mismas que para las reacciones de detección de fitoplasmas. Las reacciones de PCR se llevaron a volumen final de 15 μ L, con 0,05 U/ μ L de *Taq* polimerasa (Bioline), buffer de la enzima 1X, 1.5 mM de MgCl₂, 0,2mM de dNTPs (Bioline), 0.2 μ M de cada iniciador y 1 μ L de ADN total (20-50 ng) en la reacción de PCR. El control negativo de la reacción con los iniciadores rpsF/rpsR2 fue una reacción sin ADN. El perfil térmico usado se muestra en la figura 5-5 como perfil A, con 1 min de denaturación, 1 min de anillamiento y 2 min extensión, utilizando un termociclador PT-100 (MJ Research). El ADN total vegetal que generó el producto esperado, se usó como molde en las reacciones posteriores de PCR.

Para la detección de fitoplasmas, los extractos de ADN tanto de plantas como de insectos se usaron para amplificar un segmento del gen 16S rRNA de fitoplasmas por PCR. En la detección rutinaria de fitoplasmas se realizan amplificaciones anidadas consecutivas, en esta técnica el producto de la reacción primaria se diluyó 1:20 en agua y 2 μ L de la dilución se usaron como molde en las reacciones anidadas. La reacción primaria se realizó con los iniciadores P1/P7 o P1A/P7A y posteriormente se realizaron una o dos reacciones PCR anidadas usando diferentes pares de iniciadores que permiten amplificar el ADN de fitoplasmas, los iniciadores utilizados se listan en la tabla 5-1.

Tabla 5-1. Iniciadores utilizados en las reacciones de detección de fitoplasmas sobre la región 16S rRNA-23SrRNA.

Reacción	Iniciador	Secuencia 5'-3'	Sentido	Referencia	
Primaria	P1	AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT	Forward	Smart <i>et al.</i> , 1996	
	P7	CGTCCTTCATCGGCTCTT	Reverse		
	P1A	ACGCTGGCGGCGCGCCTAATAC	Reverse	Lee <i>et al.</i> , 2004	
	P7A	CCTTCATCGGCTCTTAGTGC	Forward		
Anidada o primaria	R16F2n	GAAACGACTGCTAAGACTGG	Forward	Gundersen y Lee, 1996	
	R16R2	TGACGGGCGGTGTGTACAAACCCCG	Reverse		
Anidada	R16mF2	CATGCAAGTCGAACGGA	Forward		
	R16mR1	CTTAACCCCAATCATCGAC	Reverse		
	fU5	CGGCAATGGAGGAAACT	Forward		Seemüller <i>et al.</i> , 1994
	rU3	TTCAGCTACTCTTTGTAACA	Reverse		
	PhyRNAF3.3	AATAGTGGAAAACTATC	Forward	Gaitán, 2003	
	PhyRNAR2.6	TTTCTATAACTTTGCAGA	Reverse		

Tabla 5-2. Parejas de iniciadores utilizadas, temperaturas de anillamiento y producto esperado.

Iniciadores	Temperatura anillamiento	Producto esperado
P1/P7	55°C	1830 pb
P1A/P7A	55°C	1800 pb
R16mF1/R16mR2	54° C	1430 pb
R16F2n/R16R2	54° C	1250 pb
fU3/rU5	53° C	890 pb
PhyRNA3.3/PhyRNA2.6	53 ° C	550 pb
rpsF/rpsR2	53 ° C, 54°C y 55°C	800 pb

En algunas reacciones de PCR se utilizaron como controles positivos, dos clones disponibles en el laboratorio. pMBS (Hernández y Cruz, 2006) es un plásmido TOPO, con un inserto de la región 16S-23S entre los iniciadores P1/P7 de la cepa de fitoplasmas que causa “*Maize bushy stunt*” y el pC5 (Cruz, M, 2004), un plásmido pGEMT-Easy con un inserto de la región del gen 16S rRNA entre los iniciadores P1/Tint de la cepa de fitoplasmas que causa “*Ash Yellows*” en Estados Unidos. Durante el transcurso del trabajo, también se usaron y evaluaron como controles positivos, diferentes extractos de ADN vegetal, provenientes de plantas infectadas con diferentes cepas de fitoplasmas (Tabla 5-3), los cuales fueron gentilmente donados por el Dr. Harrison y la Dra. Bertacini.

Tabla 5-3. Controles positivos, ADN total de plantas infectadas con diferentes cepas de fitoplasmas.

Acrónimo	Cepa de fitoplasma	Clasificación (Subgrupo 16Sr)	Fuente
LY	<i>Letal yellows</i>	16SrIV	Nigel Harrison (U. Florida)
EY1	<i>Elm Yellows</i>	16SrV	
MBS	<i>Maize Bush Stunt</i>	16Srl	
PPWB	<i>Pigeon Pea witches Broom</i>	16SrIX-A	
BA	<i>Stolbur</i>	16SrXII-A	Assunta Bertacinni (U. Bologna)
PVM	<i>Aster Yellows</i>	16Srl-A	
AY1	<i>Aster Yellows</i>	16Srl-B	
CA	<i>Aster Yellows</i>	16Srl-C	
AshY3	<i>Ash Yellows</i>	16SrVII-A	

Los amplicones obtenidos por PCR se separaron en electroforesis en gel de agarosa (Bioline) al 1%, con buffer TBE1X, con las mismas condiciones de electroforesis explicadas en el numeral 5.3.3. Los amplicones obtenidos en las reacciones anidadas se purificaron a partir de la reacción o las bandas de electroforesis se cortaron con cuchilla estéril para su purificación y posterior secuenciación, restricción o clonación, como se explica a continuación.

5.3.5 RFLP

En el análisis por RFLP, para identificar los subgrupos de fitoplasmas correspondientes, amplicones seleccionados obtenidos con los iniciadores R16F2n/R16R2 se digirieron con las endonucleasas de restricción: *AluI*, *MseI*, *RsaI* o *HinfI* (New England Biolabs). En cada caso se prepararon reacciones a volumen final 20 µL empleando el buffer recomendado por el fabricante a una concentración final 1x y 0,05 U/µL de enzima. En cada reacción se usaron como molde entre 5 y 7 µL del producto de PCR. Todas las reacciones se incubaron durante 16 h a 37 °C. Los productos de la reacción de digestión se separaron en gel de agarosa al 3% preparado en buffer TBE 1X y se visualizaron con tinción de bromuro de etidio y radiación UV.

Adicionalmente se usaron herramientas de análisis de RFLP *in silico* como *iphyclassifier* del USDA (<http://plantpathology.ba.ars.usda.gov/cgi-bin/resource/iphyclassifier.cgi>, Zhao *et al.*, 2009) y el programa libre pDRAW32 versión 1.1.115 (Acaclone).

5.3.6 Secuenciación de productos de PCR

Amplicones seleccionados se purificaron conforme a las instrucciones del Kit PCR Clean-up (MoBio) y las bandas cortadas a partir de los geles de agarosa se purificaron con el Kit Gel-Spin (MoBio) para enviar a secuenciar. La secuenciación se hizo en las dos cadenas empleando los iniciadores usados en la PCR que dio origen al amplicón o iniciadores internos. El servicio de secuenciación se realizó en las compañías Macrogen en Corea, Eurofins en Alemania o en el departamento de Ciencias Vegetales de la Universidad de Nottingham, Inglaterra.

5.4 Clonación de Productos de PCR

Algunos amplicones obtenidos con los iniciadores R16F2n/R16R2, fueron clonados para obtener secuencias de buena calidad. Los amplicones se insertaron en el vector de clonación pGEM-T Easy (Promega) (figura 5-3).

La reacción de ligación se realizó usando 0,5 μ L de ligasa T4 (100u) (Promega), 0,5 μ L de vector en relación 1:3 con el inserto y 1X de buffer de ligación en volumen final 5 μ L, a temperatura ambiente por 1h. Se incluyeron como controles de ligación, un blanco sin ADN y un control de ADN positivo incluido en el kit de Promega.

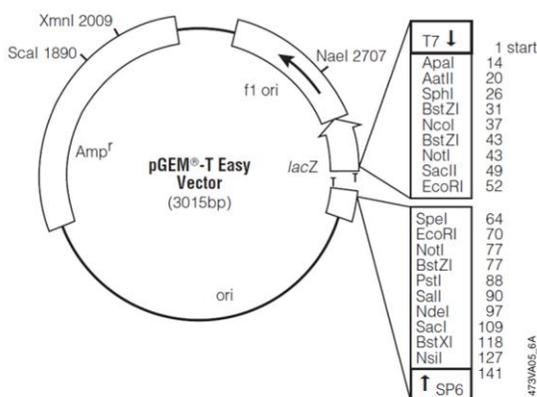


Figura 5-3. Mapa del Vector pGEM-T Easy (Promega). Tomado del manual técnico del fabricante.

Los productos de la ligación, se transformaron en 25 μ L de células competentes de *Escherichia coli* α -Select Bronze (Bioline) con 2,5 μ L de mezcla de ligación. La transformación se realizó incubando las células competentes con el producto de ligación en hielo, por 20 min seguido por un choque térmico de 45 s a 42°C y una incubación en hielo de 2 min. Posteriormente se agregaron 0,5 ml de medio SOC (Tryptona 2%, Extracto de levadura 0.5%, Glucosa 0.4%, NaCl 10mM, KCl 2.5 mM, MgCl₂ 5mM, MgSO₄ 5mM) a las células transformadas, las cuales se incubaron a 37°C por 1,5 h. Luego de la incubación, se plaquearon 50 y 100 μ L en cajas de LB-agar suplementadas con Amp (0.1mg/ml), IPTG (0.5mM) y X-Gal (0.1mg/ml). Las placas se incubaron toda la noche a 37°C. Al día siguiente se seleccionaron las colonias blancas, las cuales se transfirieron a una nueva caja de LB-agar suplementada con Amp (0.1mg/ml), IPTG (0.5mM) y X-Gal (0.1mg/ml). Para confirmar la transformación se realizó PCR a la colonia con los iniciadores M13R (5'-TCACACAGGAAACAGCTATGAC-3') y M13F (5'-CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC-3'), el producto de PCR se purificó y fue enviado a secuenciar.

5.5 Análisis bioinformático de secuencias del gen 16S rRNA de fitoplasmas

Cada una de las secuencias obtenidas de plantas o de insectos, se comparó con la base de datos GenBank empleando la herramienta nBLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) para determinar la similitud con las secuencias del gen 16S rRNA depositadas en la base de datos. Las secuencias que presentaron similitud con fitoplasmas por BLAST se verificaron manualmente, revisando nuevamente los cromatogramas (Chromas Lite 2.1.1, Technelysium) y posteriormente se alinearon con el complemento reverso de secuencias obtenidas con iniciadores para la otra hebra de ADN, para producir secuencias consenso. Las secuencias consenso editadas se compararon mediante alineamientos múltiples con CLUSTALW (desde el programa BioEdit versión 7.1.3) con 50 secuencias de cepas representativas de diferentes grupos de fitoplasmas y secuencias de fitoplasmas reportadas en Colombia (Anexo B). Posteriormente se construyeron dendogramas en MEGA versión 5 (Tamura *et al.*, 2011) usando el algoritmo de distancia *Neighbor-Joining* y con un valor de 'bootstrap' de 1000 réplicas.

Adicionalmente, las secuencias obtenidas de la región R16F2n/R16R2 (1250 pb) se compararon con las de otros fitoplasmas empleando la herramienta de clasificación de fitoplasmas interactiva en línea, *rPhyClassifier* (Zhao *et al.*, 2009). Esta herramienta permite la comparación de patrones de RFLP *in silico* (obtenidos con 17 enzimas de restricción) derivados de las secuencias obtenidas en este trabajo con una base de datos que representa todos los grupos y subgrupos 16S de fitoplasmas conocidos. Además, calcula un coeficiente de similitud entre la secuencia de interés y las conocidas, de forma que el umbral de similitud para establecer un subgrupo es de 0.97 o inferior.

5.6 Ensayos de transmisión

Para los ensayos de transmisión, se utilizaron plantas de frijol arbustivo (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad Cerinza (Semicol S.A) como plantas indicadoras de la transmisión de fitoplasmas de las dos morfoespecies de insectos seleccionadas. Los ensayos se realizaron en jaulas, mantenidas en invernadero (Campus Nueva Granada), con luz natural y temperatura promedio de 20°C (+/- 10°C). Durante todo el proceso, las plantas se mantuvieron en jaulas de velo suizo para evitar la visita no controlada de insectos. Las plantas de frijol se germinaron en turba, con riego por micro aspersion. Luego de 3 semanas, las plántulas se trasplantaron a tierra: cascarilla (2:1) estéril.

Los ensayos de transmisión se realizaron con dos morfoespecies de cicadélidos para los cuales previamente se había demostrado por PCR anidada que eran portadores de fitoplasmas. Cuando las plantas de frijol tenían 6 semanas de edad, se hicieron colectas de insectos en pastizales de las zonas de estudio, que crecen alrededor de árboles con síntomas de fitoplasmosis. Los insectos se capturaron con una red entomológica y se mantuvieron vivos en frascos plásticos con pasto. Los insectos adultos de las dos morfoespecies escogidas, se seleccionaron mediante observación al estereoscopio. Con el fin de garantizar la inoculación de las plantas de frijol, se hicieron dos introducciones de insectos. En la primera, se usaron 5 individuos adultos por planta y luego de 2 semanas se introdujeron aproximadamente 15 individuos adultos por planta de frijol. Para asegurar que los insectos se alimentaran de las plantas de frijol, estos se colocaron en bolsas de velo suizo, las cuales se ataron sobre una rama, obligando a los insectos a permanecer en contacto con la planta. Los insectos que murieron después de la introducción fueron recogidos en la bolsa de velo suizo (figura 5-4) y se almacenaron a -70°C hasta realizar la extracción de ADN.



Figura 5-4. Fotografía del interior de una jaula de un ensayo de transmisión. La flecha señala la bolsa de velo suizo que contenía los insectos, atada a una rama.

Para el ensayo con la morfoespecie 04 (MF04), los insectos se capturaron en el área de Teusaquillo (Campus Universidad Nacional) y se evaluaron sobre 5 plantas de fríjol, mientras que para el ensayo con la morfoespecie 05 (MF05), los insectos se capturaron en el área de Chicó (Separador Av. Novena con Calle 94) y el ensayo se realizó sobre 4 plantas de fríjol. Una planta de fríjol de la misma edad y mantenida bajo las mismas condiciones pero libre de insectos se utilizó como testigo.

Las plantas se mantuvieron en el invernadero por 13 semanas, al finalizar este periodo de tiempo, el material vegetal de raíces y parte aérea, se limpió y congeló. La presencia de fitoplasmas se evaluó en las muestras de insectos y plantas como se describe en el numeral 5.3.

5.7 Detección por PCR de genes con importancia potencial en la interacción vector-patógeno.

Con el fin de conocer más acerca de las secuencias de los genes *Imp* y *Amp* en los fitoplasmas encontrados en Bogotá, se hicieron ensayos iniciales de estandarización de PCR con iniciadores reportados por otros autores. Se realizaron alineamientos múltiples de 14 secuencias del gen *Imp* y 18 secuencias del gen *Amp* reportadas en el GenBank (Tabla 2-2) y se compararon con iniciadores reportados por otros autores para amplificar estos genes de fitoplasmas. Se seleccionaron dos juegos de iniciadores (Tabla 5-4), teniendo en cuenta que el producto de la amplificación de los iniciadores incluyera cada gen completo y parte de la región intergénica que flanquea cada gen, ya que las regiones intergénicas son más conservadas y los genes IDPs son muy variables.

Las reacciones de amplificación se realizaron en condiciones iniciales en volumen final de 15 µl, con 1U de *Taq* polimerasa (Bioline), a concentración final 1X del buffer correspondiente de la enzima, 1.5 mM de MgCl₂, 200µM de dNTPs (Bioline), 0.2µM de cada iniciador y 1µL de ADN total (20-50 ng). Se evaluaron diferentes condiciones de ciclaje en la PCR (Perfil B y C figura 5-5).

Tabla 5-4. Secuencias de los iniciadores que amplifican región con genes *Amp* e *Imp* de fitoplasmas.

Iniciadores	Secuencia 5' -3'	Fragmento esperado	Gen	Referencia
ES-1	TTGAGCTCGCGGCCGCATGAAACAAAAACAATTATC	3.6 Kb	<i>Amp</i>	Arashida <i>et al.</i> , 2008
Nad-2	TTT GCC TGA TTG AAA CCA TCT			
Rnc-1	GGCATTATGACTAAAAAAGAGCTCAAGC	5 Kb	<i>Imp</i>	Kakizawa <i>et al.</i> , 2009
PssA-1	ATATCAGGCGTTTGTGATATGTTTGATGG			

Los iniciadores para estos genes se evaluaron utilizando como ADN molde, ADN total de plantas infectadas con diferentes cepas de fitoplasmas conocidos (Tabla 5-3). Utilizando este ADN control se buscó optimizar las condiciones de reacción de PCR con diferentes temperaturas de anillamiento, diferentes concentraciones de $MgCl_2$ y tres perfiles de amplificación (figura 5-5).

Para el gen *SecA*, uno de los genes involucrados en el sistema de secreción de fitoplasmas, y que se emplea para definir los subgrupos de los fitoplasmas, se usaron iniciadores (Tabla 5-5) reportados por el grupo de Matthew Dickinson (Bekele *et al.*, 2011) que han permitido la detección en muestras con baja concentración fitoplasmas (Hodgets *et al.*, 2008). Para la amplificación de este gen, se realizaron dos rondas de amplificación. La reacción primaria se realizó con los iniciadores SecAR3/SecAF1, con el perfil térmico usado para el gen 16S rRNA, la temperatura de anillamiento fue de 53°C y la polimerasa MangoMix (Bioline). Posteriormente, para la reacción anidada con los iniciadores SecAR2/SecAF5 se realizó una dilución del producto de PCR primaria 1:40 en agua y 2µL se usaron como molde. Los productos de la reacción se separaron en gel de agarosa al 1% y el tamaño de los fragmentos esperados en cada reacción se muestra en la figura 5-6.

Tabla 5-5. Secuencias de iniciadores para amplificación gen *SecA*.

Iniciadores	Secuencia 5' -3'
SecAfor1	GARATGAAAACCTGGGAAGG
SecArev3	GTTTTGTCAGTTCCTGTCATNCC
SecArev2	CCNTRCTAAATTGNCGTCC
SecAfor5 a	GARATGAAAACCTGGGAAGG
SecAfor5 b	ASTCGTGAAGCTGAAGG
SecAfor5 c	AGCTAAAAGAGAATTTGAGG
SecAfor5 d	CTGATAGAGAAGCTAATGG

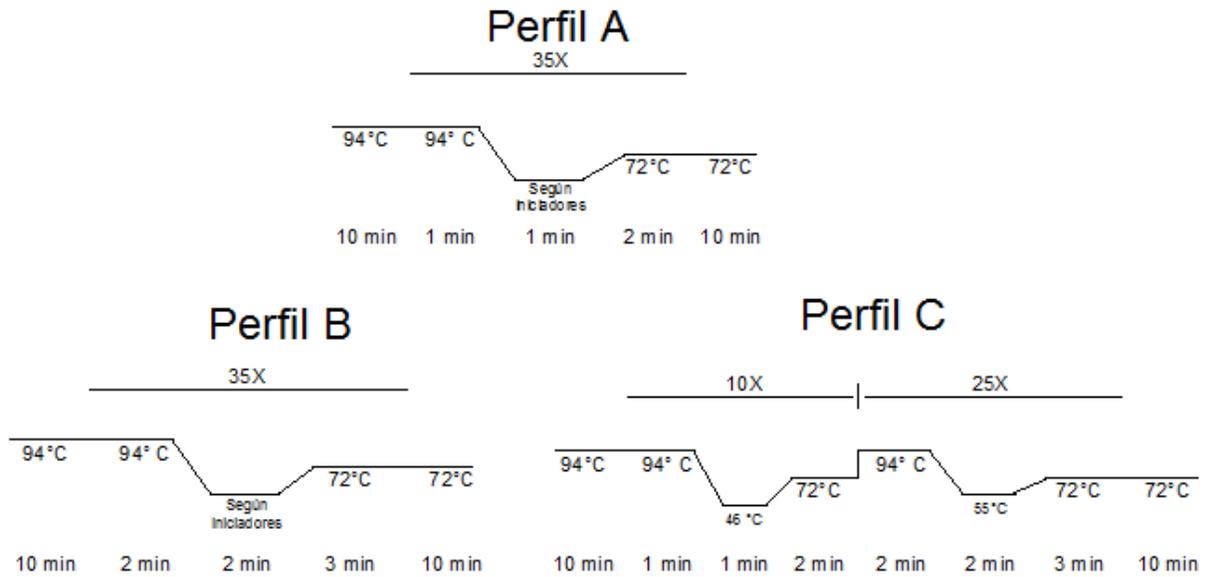


Figura 5-5. Perfiles térmicos usados en las reacciones de amplificación por PCR

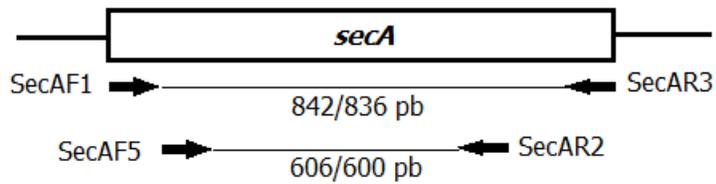


Figura 5-6. Parejas de iniciadores y producto esperado en reacción primaria y anidada del gen *secA* de fitoplasmas.

6.RESULTADOS

6.1 Determinación de morfoespecies de la familia Cicadellidae portadoras de fitoplasmas en Bogotá

6.1.1 Muestreo de Insectos

En Colombia, existe poco conocimiento acerca de la familia Cicadellidae, pero observaciones preliminares del grupo de investigación indicaban la presencia de individuos de esta familia en pastos de las zonas verdes de la ciudad. Con el fin de buscar cicadélidos posibles portadores de fitoplasmas, se hicieron muestreos en Bogotá. En nueve muestreos realizados entre Mayo del 2011 y Abril del 2012 se capturaron cicadélidos en separadores de avenidas y parques en la ciudad de Bogotá de las dos zonas de estudio. Según las características morfológicas externas, los individuos colectados se agruparon en 9 morfoespecies (MF01-MF09) (Tabla 6-1), las fotografías de las morfoespecies se presentan en la figura 6-1. Siete especies fueron colectadas en pastizales y sólo dos asociadas a los árboles *Populus nigra* y *Croton spp.*

Tabla 6-1. Sitio de recolección y hábitat de las morfoespecies de cicadélidos colectados en muestreos en las dos áreas de estudio.

Morfoespecie	Área	Hábitat	No. Individuos adultos	Familia	Subfamilia
MF01	Chicó	Pasto	1	Cicadellidae	Typhlocybinae
MF02	Chicó	Pasto	1		Typhlocybinae
MF03	Chicó	Pasto	1		No asignada
MF04	Teusaquillo y Chicó	Pasto	60		Deltocephalinae
MF05	Teusaquillo y Chicó	Pasto	36		Deltocephalinae
MF06	Chicó	Pasto	69		Deltocephalinae
MF07	Chicó	Pasto	8		Xestocephalinae
MF08	Chicó	<i>Populus nigra</i>	24		Typhlocybinae
MF09	Teusaquillo	<i>Croton spp.</i>	63		No asignada

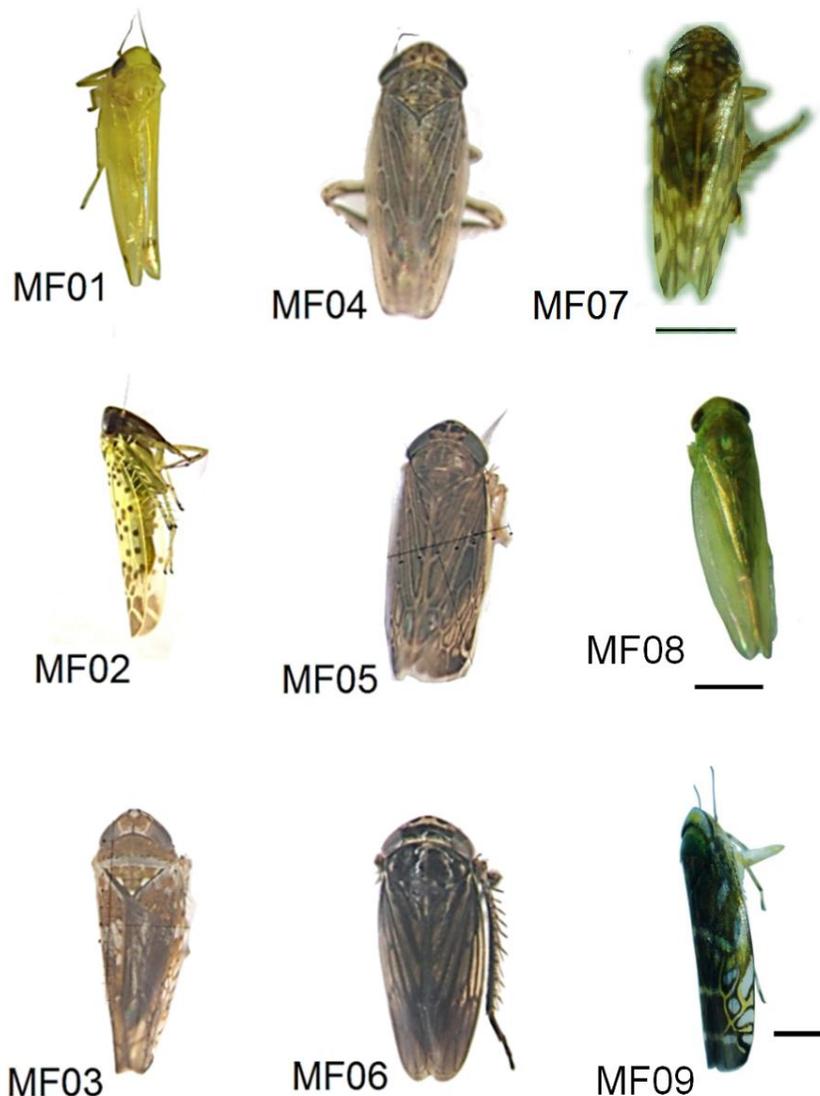


Figura 6-1. Fotografías de las morfoespecies de cicadélidos colectados en Bogotá en las dos áreas de estudio (Barra 1mm).

6.1.2 Muestreo de árboles aledaños a *Fraxinus uhdei*

Observaciones previas del grupo de investigación sugerían la presencia de síntomas de fitoplasmosis en árboles de otras especies y con el fin de ampliar la visión del patosistema, se decidió estudiar la presencia de fitoplasmas en algunas especies seleccionadas por su importancia ambiental en la ciudad. Las observaciones se hicieron en árboles de las especies *Croton* spp., *Pittosporum undulatum* y *Populus nigra* que crecen en cercanías a *Fraxinus uhdei*. En la especie *P. undulatum*, en las dos áreas de estudio se observaron individuos con brotes epicórmicos, follaje en copo, escobas de bruja y elongación de entrenudos que generan una apariencia no uniforme de la corona (figura 6-2). Árboles de las dos zonas de *P. nigra* mostraban copas con amarillamiento, ramas con marcada pérdida de la dominancia apical y elongación atípica de los

entrenudos apicales lo que resultaba en cambios en la arquitectura de la copa (figura 6-3).



Figura 6-2. Fotografías de árboles de *P. undulatum* con síntomas de fitoplasmosis en Bogotá. **(a)** La flecha señala una rama con rebrotes en el tronco, se observa también muerte de algunas ramas y la pérdida de la apariencia compacta de la copa, característica de la especie. **(b)** Se observan dentro del círculo ramas en copo que sobresalen de la copa del árbol. **(c)** Los brotes epicórmicos en la base del tallo se señalan con flechas.

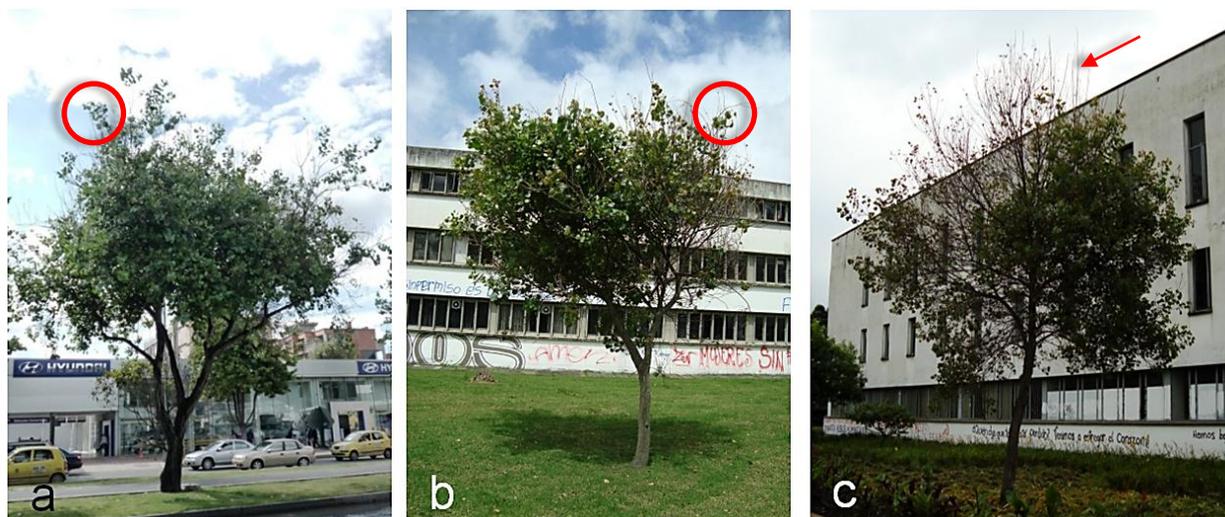


Figura 6-3. Fotografías de árboles de *P. nigra* con síntomas de fitoplasmosis, en todos los casos se observan coronas con arquitectura anormal. **(a)** y **(b)** Se observan ramas en copo dentro de los círculos. **(b)** Pérdida de la dominancia apical. **(c)** Se señala con la flecha elongaciones anormales de las ramas apicales, adicionalmente se observa defoliación en sólo la mitad del árbol.



Figura 6-4. Fotografías de *Croton* spp. con síntomas de fitoplasmosis. **(a)** Las flechas señalan una proliferación excesiva y anormal de estructuras similares a hojas (“hojillas”) que cubren casi la totalidad de las ramas. **(b)** Detalle de una rama con “hojillas”, estas estructuras son similares a hojas pequeñas, engrosadas y con desarrollo excesivo de tricomas. **(c)** Se observa un árbol con apariencia de corona transparente. **(d)** Manchas marrón en el tejido vascular, se señalan con la flecha algunas de ellas. **(e)** Entorchamiento anormal de hojas jóvenes se señala con la flecha una hoja anormal.

En árboles de *Croton* spp. se observaron síntomas un poco diferentes según la ubicación del árbol. Por ejemplo, en los árboles en el Campus de la Universidad Nacional (Teusaquillo, Área 1), se observaron coronas transparentes, entorchamiento de hojas o manchas en los haces vasculares (figura 10 C- E). Por otra parte, los síntomas observados en individuos localizados en el Park Way (Teusaquillo, Área 1), las calles 82 y 94 (Chicó, Área 2), correspondían principalmente a rebrotes anormales con estructuras similares a “hojillas” (figura 10 A y B). Estos síntomas descritos en las tres especies de árboles cercanos a *F. uhdei*, corresponden a alteraciones de la morfología típica de las tres especies y sugieren fitoplasmosis.

De cada especie de árbol se recolectaron diferentes muestras para la extracción de ADN, de *P. undulatum* se recolectaron muestras de ramas de cinco árboles, de *Croton* spp., se muestrearon 6 árboles y de *P. nigra*, sólo se pudo acceder a tres árboles con

ramas vivas. En el anexo C (Tabla C-2) se listan las muestras de ADN total de árboles muestreados y evaluados en este trabajo.

6.1.3 Detección de fitoplasmas en insectos

Luego de realizar las extracciones de ADN, se evaluó su calidad por electroforesis. Los métodos empleados tanto para insectos como para plantas permitieron obtener extractos de ADN total (figura 6-5). En el anexo C (Tabla C-3) se lista la denominación del ADN total de insectos por morfoespecies, por convención las muestras de ADN total de insectos se anteceden de “i”.

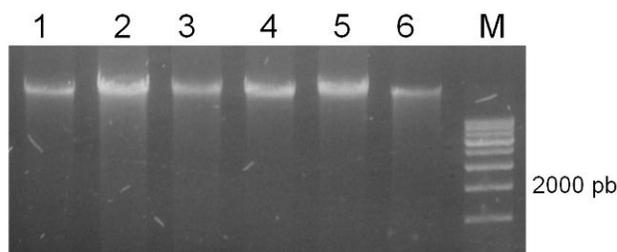


Figura 6-5. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de ADN total de morfoespecies de insectos. (1: MF06, 2: MF06, 3: M05, 4: MF04, 5: MF04 y 6: MF07). M: Marcador de peso molecular HyperLadder 500pb (Bioline).

Para la detección de fitoplasmas en muestras de ADN total de insectos, se usaron los iniciadores P1A/P7A en todas las reacciones de PCR primarias (figura 6-6 A). Con estos iniciadores no se observó por electroforesis un producto del tamaño esperado en las muestras evaluadas pero sí en los controles positivos (ADN total de plantas infectadas con las cepas de fitoplasmas CA y MBS, ambas del grupo 16Srl). Los amplicones de la reacción primaria se usaron como molde en las reacciones anidadas con los iniciadores R16F2n/R16R2 pero tampoco se obtuvieron amplicones del tamaño esperado para las muestras pero sí para los controles positivos (figura 6-6 B). Entonces se realizaron PCR anidadas con los iniciadores fU5/rU3 (figura 6-6 C) y PhyRNAF3.3/PhyRNAF2.6 (figura 6-6 D). En este caso, empleando los iniciadores fU5/rU3 sí se obtuvieron productos del tamaño esperado en algunos extractos de ADN total de las morfoespecies MF04 y MF05.

Con el objeto de comparar la eficiencia de la amplificación y la obtención del amplicón R16F2n/R16R2 se amplificaron las mismas muestras usando una o dos reacciones anidas. En este ensayo, los amplicones obtenidos con P1A/P7A (figura 6-7 A), se usaron como molde para la reacción anidada con los iniciadores R16F2n/R16R2 (figura 6-7 B) y para la reacción anidada con los iniciadores R16mF2/16mR1 (figura 6-7 C), los productos de ésta última sirvieron como molde para la segunda reacción anidada R16F2n/R16R2 (figura 6-7 D). La intensidad de los amplicones obtenidos R16F2n/R16R2 fue mayor en la reacción doble anidada (figura 6-7 D) y permitió detectar amplicones del

tamaño esperado en mayor número de muestras, de las morfoespecies MF04, MF08 y MF09.

Con estas combinaciones de PCR anidadas, se evaluaron entre una y diez muestras de cada morfoespecie y se analizaron muestras de 9 morfoespecies diferentes, para un total de 35 muestras de cicadélidos analizados. La evaluación se hizo con diferentes combinaciones de iniciadores en PCR anidadas y se encontró que en todas las morfoespecies se observaban bandas del tamaño esperado para fitoplasmas. Amplicones positivos se obtuvieron sólo en algunas muestras de cada morfoespecie (Tabla 6-2), indicando que no todos los individuos muestreados eran portadores de fitoplasmas.

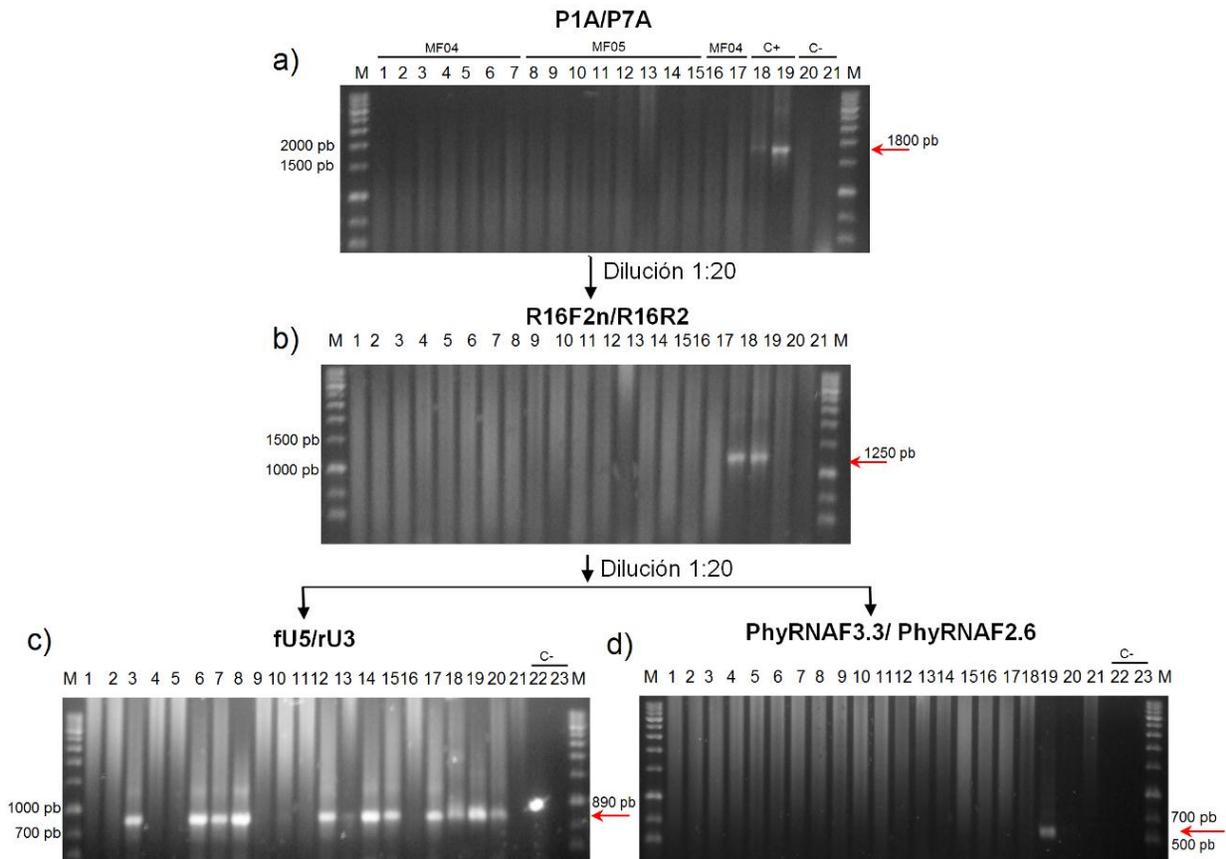


Figura 6-6. Detección de ADN de fitoplasmas en ADN total de cicadélidos mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Se realizaron reacciones anidadas consecutivas. **(a)** Reacción primaria P1A/P7A. **(b)** Reacción anidada R16F2n/R16R2. **(c)** Segunda reacción anidada fU5/rU3. **(d)** Segunda reacción anidada PhyRNAF3.3/ PhyRNAF2.6. Controles, 18: Control positivo (CA), 19: Control positivo (MBS), 20: H₂O. 21: ADN control negativo, 22 y 23: Control negativo H₂O. Muestras evaluadas (Carril: ADN genómico), 1: i06, 2: i15, 3: i16, 4: i21, 5: i22, 6: i23, 7: i24, 8: i4, 9: i7, 10: i8, 11: i10, 12: i11, 13: i14, 14: i18, 15: i9, 16: i17, 17: i19. M: Marcador de peso molecular: Hypperladder 500bp (Bioline).

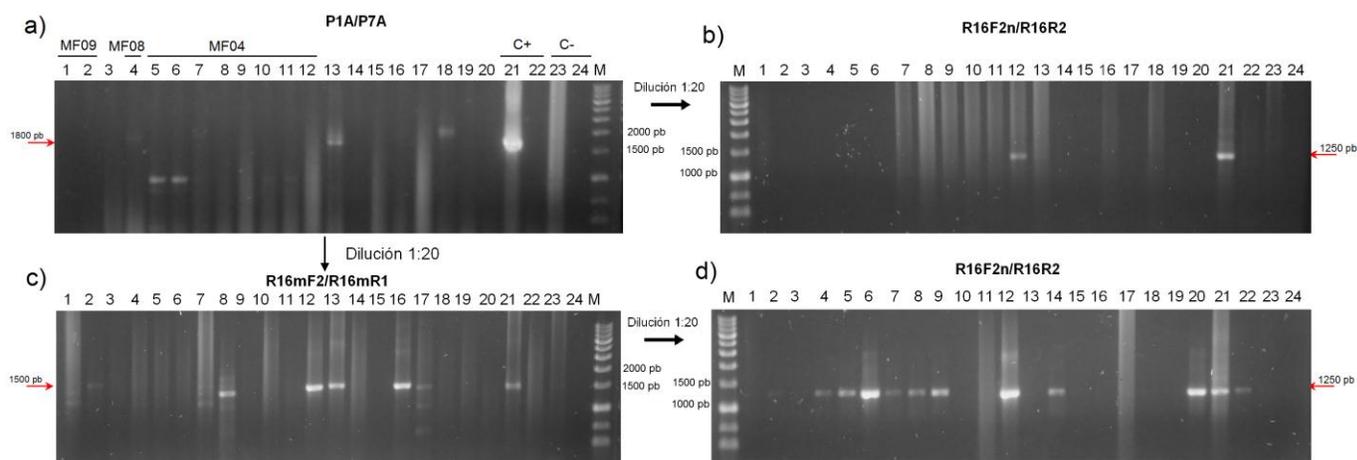


Figura 6-7. Comparación de amplicones R16F2n/R16R2 en detección de fitoplasmas por reacciones anidadas consecutivas mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Se evaluaron muestras de ADN total de cicadélidos. **(a)** Reacción primaria P1A/P7A. **(b)** Reacción anidada R16F2n/R16R2. **(c)** Reacción anidada R16mF2/R16mR1. **(d)** Segunda reacción anidada R16F2n/R16R2. Muestras (Carril: ADN total), 1: i41, 2: i42, 4: i44, 5: i45, 6: i46, 7: i47, 8: i48, 9: i49, 10: i50, 11: i51, 12: i52, 20: i60), (3: i43, 13: i53, 14: i54, 15: i55, 16: i56, 17: i57, 18: i58, 19: i59). Control positivo MF06 (21: i35), ADN de plásmido (22: pMBS), controles negativos (23: ADN sin fitoplasmas), 24: agua control negativo. Marcador de peso molecular: Hypperladder 500bp (Bioline).

Tabla 6-2. Detección de fitoplasmas en morfoespecies de cicadélidos de Bogotá con diferentes iniciadores en PCR.

Morfoespecie	ADN total	R16F2n/R16R2	fU5/rU3	PhyRNA2.6/PhyRNA3.3
MF01	i20	+	+ (3)	+
MF02	i01	-	+ (3)	-
MF03	i05	+ (3)	+ (3)	+
MF04	i06	+	-	-
	i12	+	+	-
	i13	-	+ (2)	+
	i15	+	+	-
	i16	-	+ (2)	-
	i19	-	+ (2)	-
	i21	+ (2)	+ (2)	-
	i22	-	-	-
	i23	+	+ (2)	-
	i24	+ (2)	+ (3)	-
	Pool3	+	+	+
MF05	i04	+	+	-
	i07	-	+	-
	i08	-	-	-
	i09	+	+ (3)	-
	i10	-	+	-
	i11	-	+ (2)	-
	i14	+	+	-
	i17	-	-	-
	i18	-	+ (2)	-
	i37	+	+	+
	Pool4	+	+	+
MF06	i02	-	+ (2)	-
	i03	+	-	-
	Pool5	+	+	+
MF07	i40	+	+	+
MF08	i27	-	-	-
	i31	-	-	-
	i44	-	+	-
	Pool1	+	+	+
MF09	i28	-	-	-
	i32	-	-	-
	i33	-	-	-
	i41	-	-	-
	i42	-	-	-
	i60	+	-	-
	Pool2	+	+	+

El símbolo (+) indica, las muestras en las que se obtuvieron amplicones del tamaño esperado y entre paréntesis se especifica el número de reacciones independientes en las que se obtuvo resultado positivo. El símbolo (-) indica que no se obtuvo producto del tamaño esperado por PCR.

6.1.4 Detección de fitoplasmas en árboles.

El primer paso para evaluar la presencia de fitoplasmas en los árboles muestreados de *Croton* spp., *P. nigra*, *P. undulatum* y *F. uhdei*, fue amplificar los extractos de ADN total de plantas con los iniciadores rpsF/rpsR2. Las muestras que produjeron amplicones del tamaño esperado (800 pb), fueron usadas para posteriores ensayos con iniciadores para el gen 16S rRNA, pues se consideraron que carecían de inhibidores de PCR. En el caso de muestras que no amplificaron, se utilizó el Kit de limpieza de ADN genómico (MoBio). Como se observa en la figura 6-8A, las dos primeras muestras fueron positivas, las siguientes fueron tratadas con el kit mencionado el cual eliminó los contaminantes y permitió la amplificación de las muestras (figura 6-8 B).

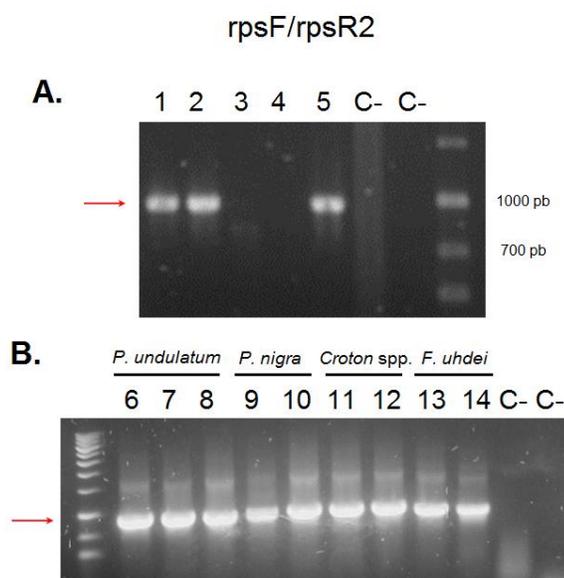


Figura 6-8. Electroforesis en gel de agarosa al 1% que muestra la evaluación de ausencia de inhibidores para PCR en ADN total de plantas. Producto de reacción con rpsF/rpsR2. **(a)** Amplicones rpsF/rpsR2 sobre ADN genómico sin usar Kit de limpieza adicional de ADN, reacción positiva (carriles 1 y 2) y reacción negativa (carriles 3 y 4). **(b)** Amplicones rpsF/rpsR2 después de usar Kit de limpieza de ADN total de árboles. Carriles 1 al 14: ADN genómico de diferentes árboles. La flecha indica el tamaño del amplicón esperado. Marcador de peso molecular, HyperLadder 500pb(Bioline).

Una vez verificada la ausencia de inhibidores en los extractos de ADN vegetal, se procedió a realizar PCR anidadas con diferentes juegos de iniciadores para amplificar el gen 16S rRNA. Al evaluar los iniciadores P1/P7 en reacción primaria no se obtuvieron amplicones del tamaño esperado en las muestras (figura 6-9 A), ni tampoco en la reacción anidada R16F2n/R16R2 (figura 6-9 B), pero sí en los controles positivos. Por lo tanto se realizó una segunda reacción anidada con los iniciadores

PhyRNA3.3/PhyRNA2.6, en este caso solo se obtuvo una muestra positiva correspondiente a la especie *P. nigra* (figura 6-9 C).

Posteriormente se evaluaron los iniciadores P1A/P7A en reacción primaria, con los cuales se obtuvieron amplicones del tamaño esperado en muestras de las especies *F. uhdei* y *Croton* spp. (figura 6-10 A). Así como también en la reacción anidada R16F2n/R16R2 (figura 6-10 B). En algunas muestras (carriles 1, 6 y 12 de la figura 6-10B) no se obtuvo el amplicón del tamaño esperado en la reacción anidada a pesar de que sí se había obtenido en la reacción primaria. Los amplicones obtenidos en la reacción anidada, se purificaron para enviar a secuenciar. En este caso no se obtuvieron amplicones del tamaño esperado en la especie *P. undulatum*.

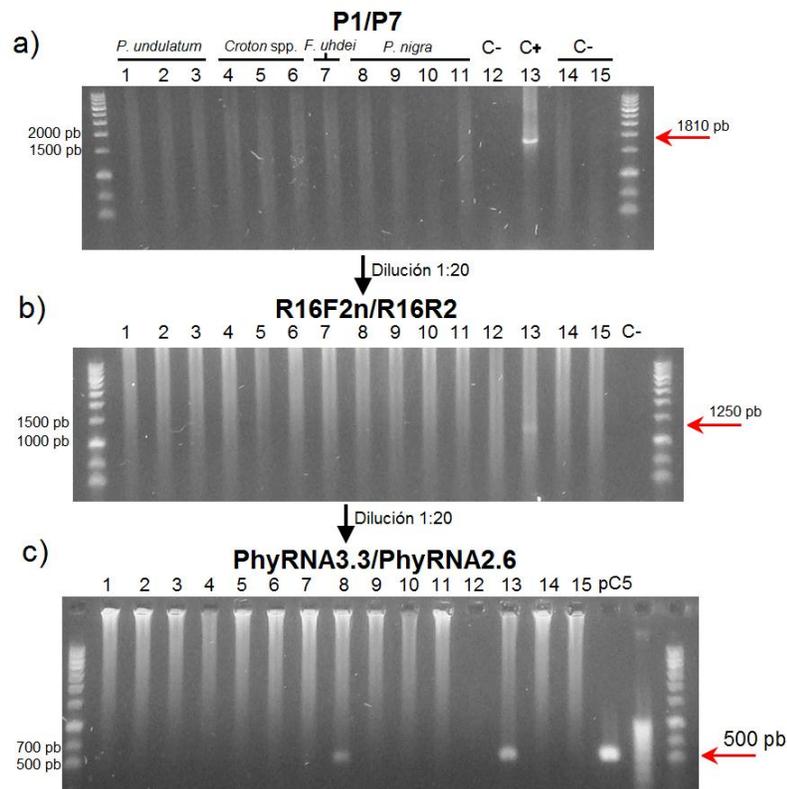


Figura 6-9. Electroforesis en gel de agarosa al 1% que muestra la detección de fitoplasmas en árboles aledaños a *F. uhdei* en Bogotá. **(a)** Reacción primaria P1/P7. **(b)** Reacción anidada R16F2n/R16R2. **(c)** Segunda reacción anidada con PhyRNA3.3/PhyRNA2.6 Las flechas señalan el amplicón del tamaño esperado en cada reacción. Muestras (Carril: ADN total), 1: ADN31, 2: ADN36, 3:ADN43, 4:ADN32, 5:ADN33, 6:ADN34, 7: ADN24, 8:ADN37, 9:ADN44, 10:ADN45, 11:ADN46) controles, 12: ADN control negativo 13: Control positivo, plásmido MBS, 14: ADN control negativo, 15: Control negativo Agua pC5: Control pC5. Marcador de peso molecular Hyperladder 500 pb (Bioline).

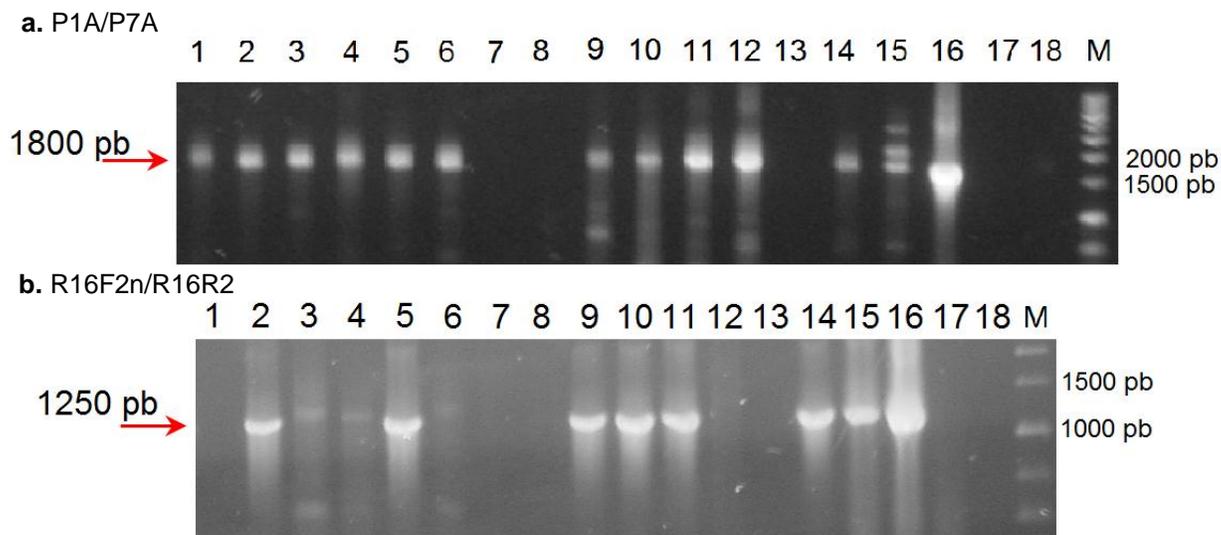


Figura 6-10. Electroforesis en gel de agarosa al 1% que muestra la detección de fitoplasmas por PCR anidada en muestras de árboles de Bogotá. **(a)** Reacción primaria P1A/P7A. **(b)** Reacción anidada con R16F2n/R16R2. Las flechas señalan el amplicón del tamaño esperado en cada reacción. *F. uhdei* carriles 1-6 (Urapán1), carril 14 (Urapán 2), *P. undulatum*, carriles 7, 8 y 13 (7: ADN30, 8: ADN31, 13:ADN36), *Croton* spp., carriles 9, 10, 11 y 12 (9: ADN32, 10: ADN33, 11:ADN34, 12: ADN35); *P. nigra* carril 14 (ADN37). Los controles negativos son carril 17 y 18; el control positivo (carril16: plásmido pMBS). Marcador de peso molecular Hyperladder 500bp (Bioline).

En otra evaluación con los iniciadores P1A/P7A en la reacción primaria, posteriormente con R16F2n/R16R2 en la reacción anidada, y finalmente en la segunda reacción anidada con los iniciadores fU5/rU3, también se obtuvieron amplicones del tamaño esperado para la especie *F. uhdei* (figura 6-11 A-C). La banda del tamaño esperado se cortó y purificó para confirmar su identidad por secuenciación.

En conclusión, se obtuvieron amplicones del tamaño esperado para fitoplasmas a partir de los dos 2 árboles evaluados de *F. uhdei*, en 2 muestras de 3 árboles de *P. nigra*, en 2 de 5 árboles de *P. undulatum* y en 4 de 5 árboles evaluados de *Croton* spp. (Tabla 6-3), a pesar que todos los árboles muestreados presentaban claros síntomas de fitoplasmosis. Para confirmar la presencia de fitoplasmas, bandas seleccionadas fueron enviadas a secuenciar o analizadas por RFLP.

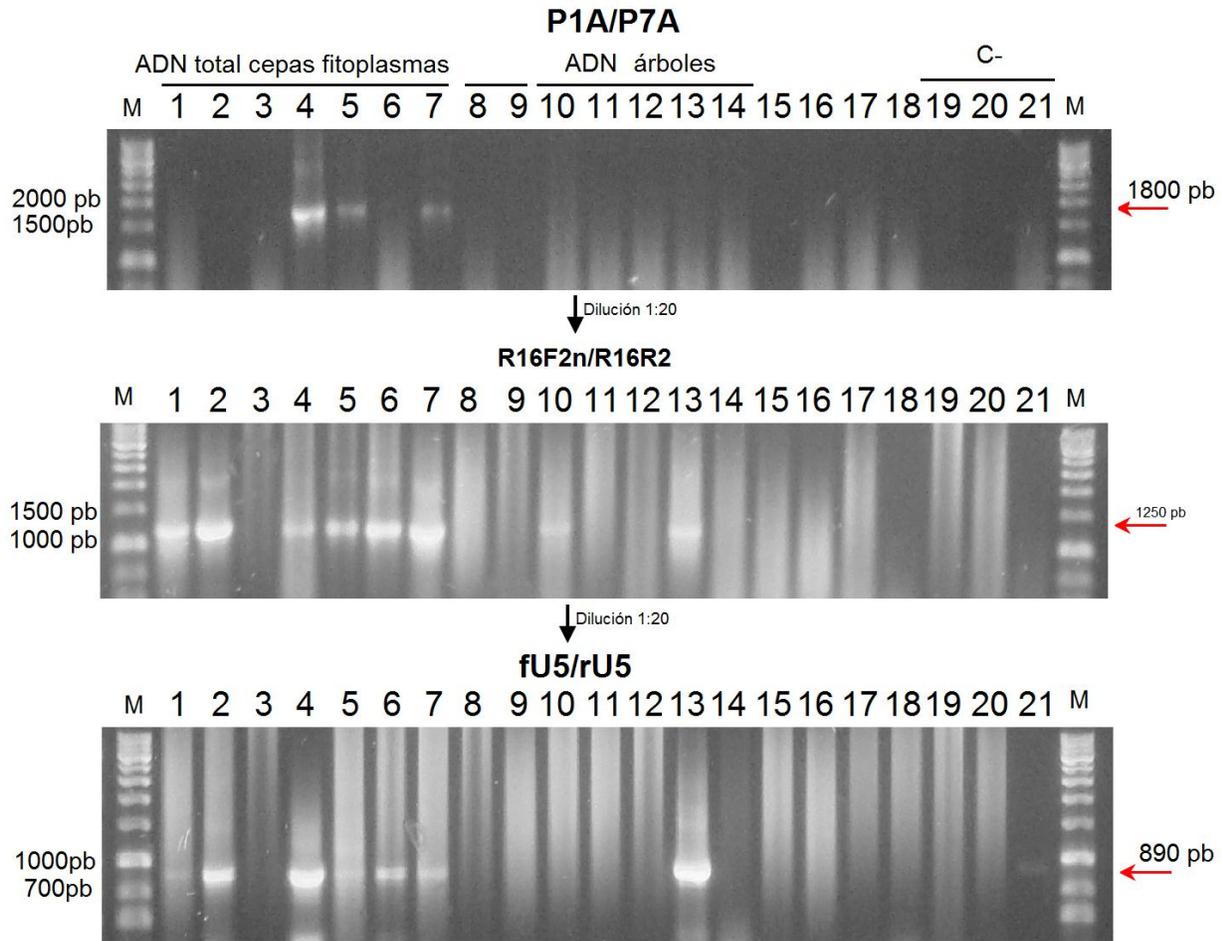


Figura 6-11. Electroforesis en gel de agarosa al 1% que muestra la detección de fitoplasmas en árboles e insectos. **(a)** Reacción primaria P1A/P7A. **(b)** Reacción anidada con R16F2n/R16R2. **(c)** Segunda reacción anidada con fU5/rU3. Las flechas señalan el amplicón del tamaño esperado en cada reacción. ADN total control positivo de plantas infectadas con cepas conocidas de fitoplasmas (tabla 5-5) 1: PVM, 2: CA, 3:LY, 4:EY1, 5:AshY3, 6:PPWB, 7:BA. Muestras (carril: ADN genómico) 8: MF04 (i16), carril9: MF05 (i9), 10: ADN33, 11:ADN36, 12:ADN37, 13:ADN24, 14:ADN24. Controles negativos, 19: ADN negativo para fitoplasmas, 20: Agua, 21: Agua. M: marcador de peso molecular Hyperladder 500 pb (Bioline).

Tabla 6-3. Detección de fitoplasmas en árboles cercanos a *F. uhdei* en Bogotá.

Especie	ADN total	R16F2n/R16R2	fU5/rU3	PhyRNA3.3/PhyRNA2.6
<i>P. nigra</i>	ADN 37	+	-	+
	ADN 44	-	-	-
	ADN 45	-	-	-
	ADN 46	-	+	-
<i>P. undulatum</i>	ADN 30	-	-	-
	ADN 31	+	-	-
	ADN 36	+	-	-
	ADN 42	-	-	-
	ADN 43	-	-	-
<i>Croton</i> spp.	ADN 32	+	-	-
	ADN 33	+	+	+
	ADN 34	+	+	-
	ADN 35	-	-	-
	ADN 52	+	-	-
	ADN 54	-	-	-
<i>F. uhdei</i>	ADN 24	+	+	+
	ADN 25	+	-	-
	ADN 26	+	-	-
	ADN 28	+	+	-
	ADN 29	-	-	-

El símbolo (+) indica, las muestras en las que se obtuvieron amplicones del tamaño esperado en cada reacción, el símbolo (-) indica que no se obtuvo producto del tamaño esperado en PCR.

6.1.5 Análisis de secuencias del gen 16S rRNA de fitoplasmas en cicadélidos y árboles de Bogotá

Amplicones seleccionados obtenidos con los iniciadores R16F2n/R16R2, fU5/rU3, PhyRNAF3.3/PhyRNAR2.6 o M13F/M13R fueron recuperados por columnas y enviados a secuenciar. En el anexo D se presentan las muestras de ADN total que generaron amplicones del tamaño esperado, de los que se obtuvieron secuencias de alta calidad, (tablas D-1 y D-2). Las secuencias obtenidas con iniciadores “*foward*” y “*reverse*” fueron editadas independientemente y posteriormente se usaron para construir secuencias consenso por superposición.

En primer lugar, se descartaron las secuencias que al ser comparadas por BLAST en el GenBank, tuvieran identidad con secuencias diferentes a fitoplasmas. Por ejemplo, en el caso de las secuencias obtenidas a partir de árboles con los iniciadores R16F2n/R16R2, entre 33 secuencias, el 72.7%, correspondió a fitoplasmas, 18.2% fueron ilegibles o de mala calidad y 9,1% correspondieron a otras bacterias. Por otro lado, todas las secuencias de buena calidad obtenidas con los iniciadores fU5/rU3 o PhyRNA3.3/PhyRNA2.6 correspondieron a secuencias de fitoplasmas.

Con aquellas secuencias provenientes del mismo individuo (planta o insecto) que representaban la región R16F2n/R16R2 del gen 16S, se construyeron alineamientos múltiples y se revisó que cada posición estaba representada por lo menos por 3 lecturas, con la que se generaron posteriormente secuencias consenso de la región completa R16F2n/R16R2. Las secuencias consenso de fitoplasmas partir de *Croton* spp., *F. uhdei*, *P. nigra* y *P. undulatum* fueron subidas al GenBank y se identifican con los siguientes números de acceso: JQ730858, JQ730859, JQ730860 y JQ730861. Estas cuatro secuencias correspondieron al grupo 16Srl y presentaron divergencias nucleotídicas entre 0.3% y 0.8%.

Posteriormente se realizaron alineamientos múltiples y análisis de distancias entre las secuencias de fitoplasmas obtenidas a partir de árboles infectados y de morfoespecies de cicadélidos con las secuencias de referencia de grupos de fitoplasmas (Anexo B). Los alineamientos se emplearon para construir dendogramas con el algoritmo *Neighbor joining* (figura 6-12, figura E-1, figura 6-13). Para facilitar la visualización se incluyeron en el dendograma final sólo algunas secuencias de grupos 16S relevantes en cada análisis.

En el análisis de la región de 1250 pb R16F2n/R16R2, se observó que las cuatro secuencias de fitoplasmas provenientes de árboles de Bogotá (JQ730858, JQ730859, JQ730860 y JQ730861), se agruparon en el clado del grupo 16Srl. Sin embargo, ninguna de las secuencias es idéntica con las secuencias del grupo 16Srl usadas en la comparación y formaron un clado aparte de las otras secuencias (figura 6-12). En las especies *P. nigra* y *Croton* spp., se obtuvieron secuencias correspondientes al grupo 16SrVII con los iniciadores PhyRNAF3.3/PhyRNAR2.6 (anexo E, figura E-1).

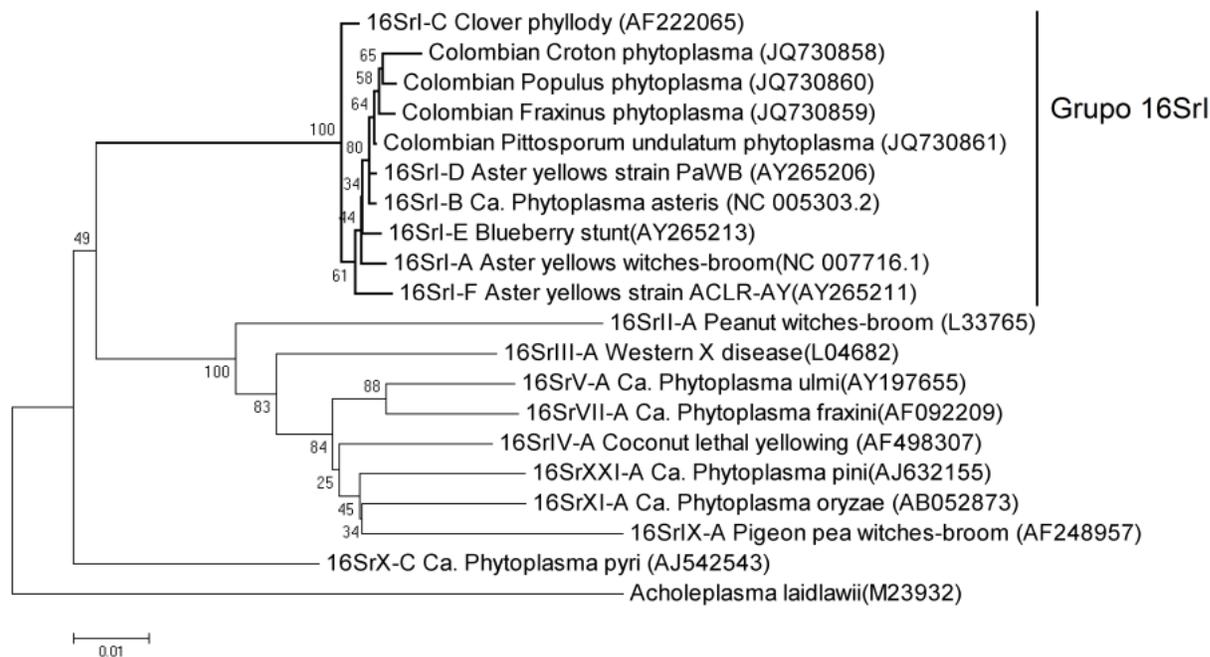


Figura 6-12. Dendrograma de distancias la región R16F2n/R16R2 empleando las secuencias JQ730858, JQ730859, JQ730860 y JQ730861 de fitoplasmas de árboles de Bogotá y secuencias referencia reportadas en GenBank. Dendrograma construido por 'Neighbour joining' 'bootstrap' de 1000 réplicas.

Con las secuencias de fitoplasmas obtenidas en cicadélidos, se analizó la región comprendida entre los iniciadores R16F2n/R16R2, de la que se obtuvieron 2 secuencias consenso a partir de la morfoespecie MF04 (T9 y S7, anexo E). Con los iniciadores fU5/rU3 y PhyRNAF3.3/PhyRNAR2.6, se obtuvieron secuencias de menor longitud (800 pb y 500pb respectivamente), que permiten comparar regiones conservadas y variables en el gen 16Sr RNA. En las nueve morfoespecies de cicadélidos evaluadas, se encontraron secuencias asociadas a fitoplasmas (Anexo D, Tabla D-2), las mencionadas secuencias se alinearon y compararon con secuencias de fitoplasmas reportadas de diferentes grupos y subgrupos 16Sr. Algunas secuencias de las morfoespecies MF01, M02, MF03, MF04, MF05, MF06 se relacionan con las secuencias del grupo 16Srl (figura 6-13) y las morfoespecies MF07, MF08 y MF09 con el grupo 16SrVII (figura E-1). Las secuencias del grupo 16Srl no son idénticas entre sí y tampoco son idénticas a las secuencias del grupo 16Srl usadas en la comparación (figura 6-13).

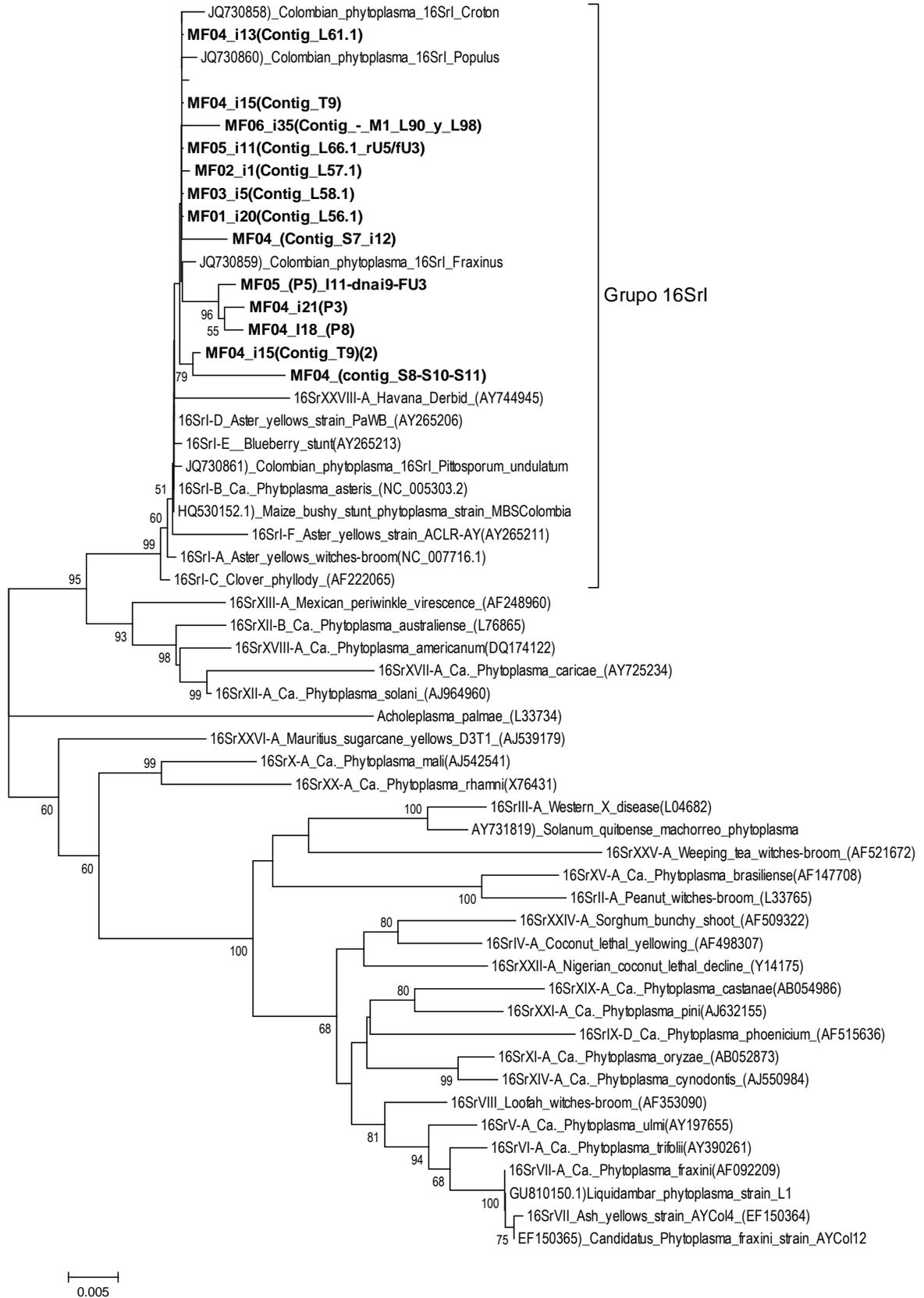


Figura 6-13. Dendrograma de secuencias región fU5/rU3 de fitoplasmas obtenidas en cicadélidos, El árbol se construyó con el método de '*Neighbor joining*' (787 posiciones), '*bootstrap*' de 1000 réplicas.

6.1.6 Análisis por RFLP *in silico*

Debido a que la asignación taxonómica de los fitoplasmas se basa principalmente en los patrones de restricción de la región comprendida entre los iniciadores R16F2n/R16R2, a partir de las secuencias consenso de esta región, se realizaron RFLP *in silico*.

Las secuencias JQ730858, JQ730859, JQ730860 y JQ730861 definidas por los iniciadores R16F2n/R16R2, correspondientes a las especies de árboles evaluadas en este trabajo, se analizaron con el software libre pDRAW32 (Acaclone) para predecir los patrones de restricción de las enzimas *AluI*, *MseI* y *RsaI*. El patrón de restricción que se generó con estas tres enzimas correspondió al grupo de fitoplasmas 16Srl, sólo se muestra el patrón para *P. undulatum* porque el RFLP *in silico* es idéntico entre las cuatro secuencias evaluadas (figura 6-14).

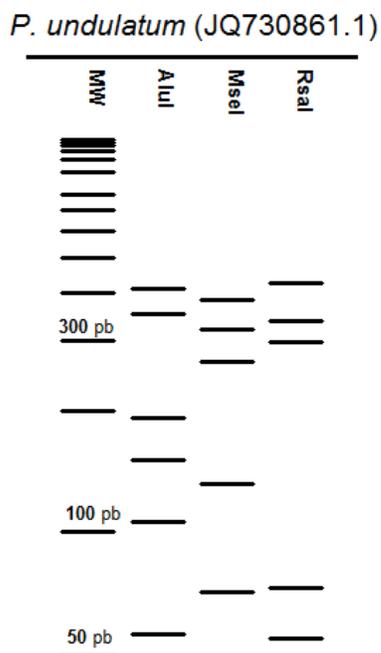


Figura 6-14. Patrón de RFLP *in silico* de secuencias consenso obtenidas con los iniciadores R16F2n/R16R2 en *P. undulatum* (JQ730861) utilizando el programa pDRAW32 (Acaclone). La digestión *in silico* se realizó con *AluI*, *MseI* y *RsaI*, la figura simula las condiciones de separación de los fragmentos en un gel de agarosa al 3%. El marcador de peso molecular (MW) corresponde al patrón del marcador HyperLadder 50pb (Bioline).

Para determinar si el patrón RFLP generado por las enzimas *AluI* y *MseI* permite discriminar entre los grupos de fitoplasmas 16SrI, 16SrIII, 16SrV, 16SrVII y 16SrXII, se compararon los patrones de restricción *in silico* de estos grupos con la secuencia de *P. undulatum* (JQ730861) utilizando la herramienta *iPhyClassifier*. Se confirmó que el patrón de las secuencias de fitoplasmas obtenidas correspondió con lo esperado para el grupo 16SrI, y que *AluI* y *MseI* sí permiten diferenciar entre los grupos de fitoplasmas 16SrI y 16SrVII, que se esperaban encontrar en las muestras (figura 6-15).

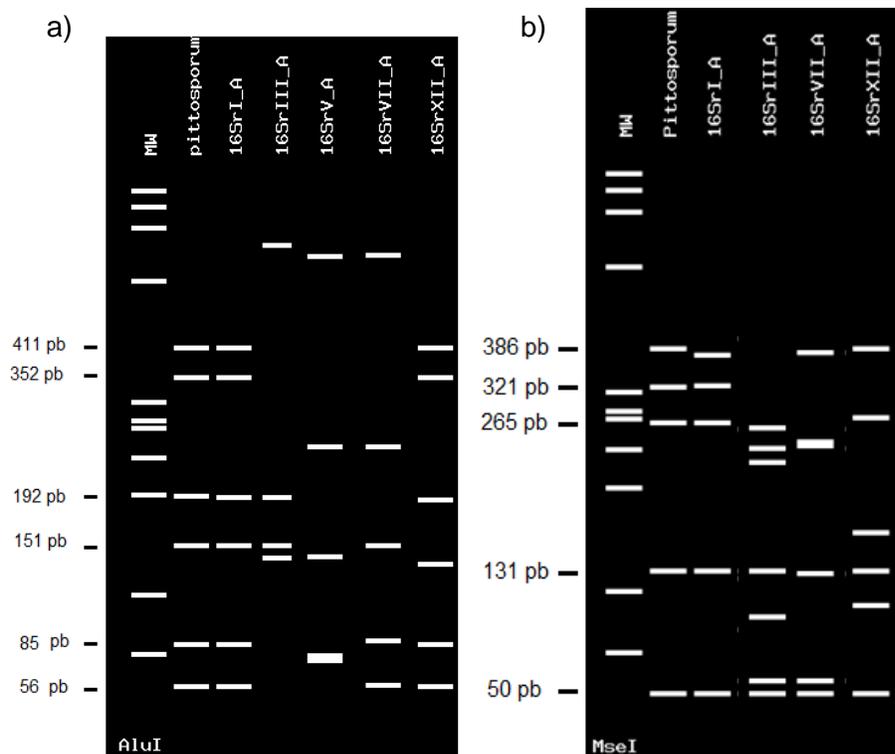


Figura 6-15. Comparación *in silico* del patrón de restricción *in silico* de la región R16F2n/R16R2 de *P. undulatum* (JQ730861) y secuencias de los grupos 16S rRNA I-A, III-A, V-A, VII-A Y XII-A, obtenidos con el programa *iPhyClassifier*. (a) Digestión con *AluI*. (b) Digestión con *MseI*.

Además, mediante la aplicación *iPhyClassifier*, se simuló la digestión con las 17 enzimas de restricción que se usan para diferenciar entre los grupos de fitoplasmas y fue posible obtener el coeficiente de similitud de RFLP de las secuencias. La secuencia JQ730861 de *P. undulatum* generó patrones RFLP *in silico* idénticos al patrón de referencia del grupo 16SrI subgrupo B (Accesión GenBank: NC_005303), con un coeficiente de similitud de 1.00, es decir que los fitoplasmas encontrados en esta especie son miembros del grupo 16SrI-B. Los patrones RFLP *in silico* de las demás secuencias fueron diferentes a los patrones de referencia de todos los grupos y subgrupos 16Sr de la base de datos de *iPhyClassifier*, pero se asemejaron más al patrón correspondiente de fitoplasmas 16SrI-B, al presentar coeficientes iguales o menores a 0.97. Los coeficientes

obtenidos fueron de 0.94 (*Croton* spp., JQ730858), 0.95 (*F. uhdei*, JQ730859), 0.94 (*P. nigra*, JQ730860), 0.97 (MF04, T9) y 0.94 (MF04, S7).

Los patrones de RFLP esperados para la secuencia JQ730859 obtenida en este trabajo y la EF150368 reportada por Gutiérrez (2006) para *F. uhdei* de Bogotá, se compararon mediante RFLP *in silico* con las enzimas *AluI*, *MseI*, *RsaI* y *HinfI*. La comparación mostró que las secuencias corresponden a los grupos 16SrVII y 16SrI (figura 6-16), las enzimas evaluadas permiten diferenciar estos grupos.

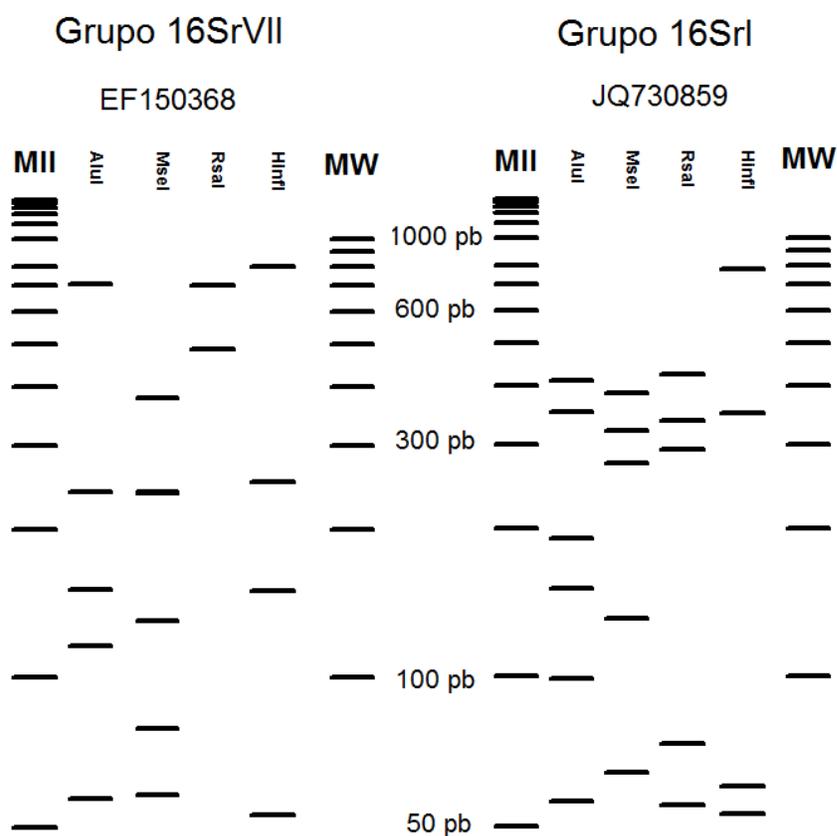


Figura 6-16. RFLP *in silico* de la región R16F2n/R16R2 de los grupos de fitoplasmas 16SrI y 16SrVII encontrados en *F. uhdei* en Bogotá. Se muestran patrones obtenidos con enzimas *AluI*, *MseI*, *RsaI* y *HinfI* generada con el software pDRAW32 (Acaclone), simulando un gel de agarosa al 3%. MII: Marcador de peso molecular HyperLadder 50pb (Bioline).

6.1.7 Ensayos de RFLP

Amplicones de 1250 pb obtenidos de *F. uhdei* y *Croton* spp., digeridos con *AluI* y *MseI*, se compararon con los patrones esperados para los grupos 16SrVII y 16SrI. Como se observa en la figura 6-17, el patrón obtenido con la enzima *AluI* fue diferente a lo esperado por digestión *in silico* (figura 6-16). Por ejemplo la digestión con *AluI* de un amplicón obtenido en *Croton* spp. generó entre otras, las bandas esperadas para el grupo 16SrVII. En el caso de *Fraxinus* sp. en la digestión con las dos enzimas (figura 6-17 Carril 2) se identificaron bandas que corresponden al patrón generado por el grupo 16SrI, como también otras bandas.

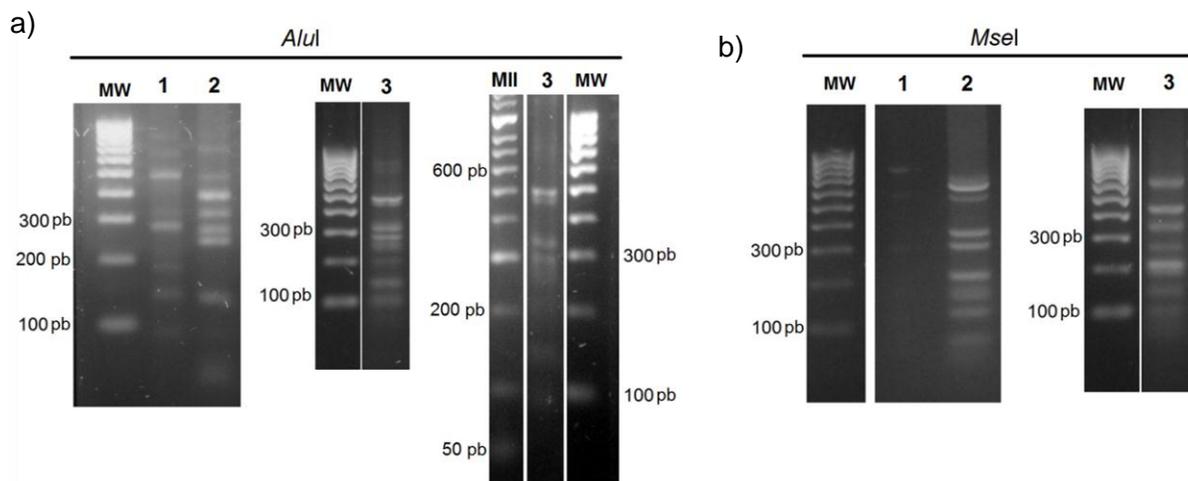


Figura 6-17. RFLP de amplicones obtenidos con R16F2n/R16R2 a partir de ADN total de árboles mediante electroforesis en gel de agarosa al 3%. **(a)** Restricción con *AluI*. **(b)** Restricción con *MseI*. Se observa el perfil de restricción obtenido, por Carril 1: *Croton* spp. (ADN 52), Carril 2: *F. uhdei* (ADN24), Carril 3: *Croton* spp. (ADN33). Marcador de peso molecular HyperLadder 100bp (Bioline), MII: Marcador de peso molecular HyperLadder 50bp (Bioline).

Los amplicones obtenidos utilizando los iniciadores R16F2n/R16R2, a partir de muestras de insectos, también se evaluaron por RFLP. La figura 6-18 muestra el patrón de bandas obtenido con la enzima *MseI* a partir de varias morfoespecies de cicadélidos y de extractos de ADN control de diferentes cepas de fitoplasmas. Sólo algunos patrones obtenidos en las morfoespecies MF04 y MF05 (carril 6 y 9, figura 6-18) corresponden al patrón esperado para el grupo de fitoplasmas 16SrIA, las demás muestras evaluadas (Carriles 3, 5 y 8) generaron patrones RFLP diferentes al de los grupos 16SrI-A y B, 16Sr-V, 16SrVII y 16SrXII, que hasta la fecha se han detectado en Bogotá.

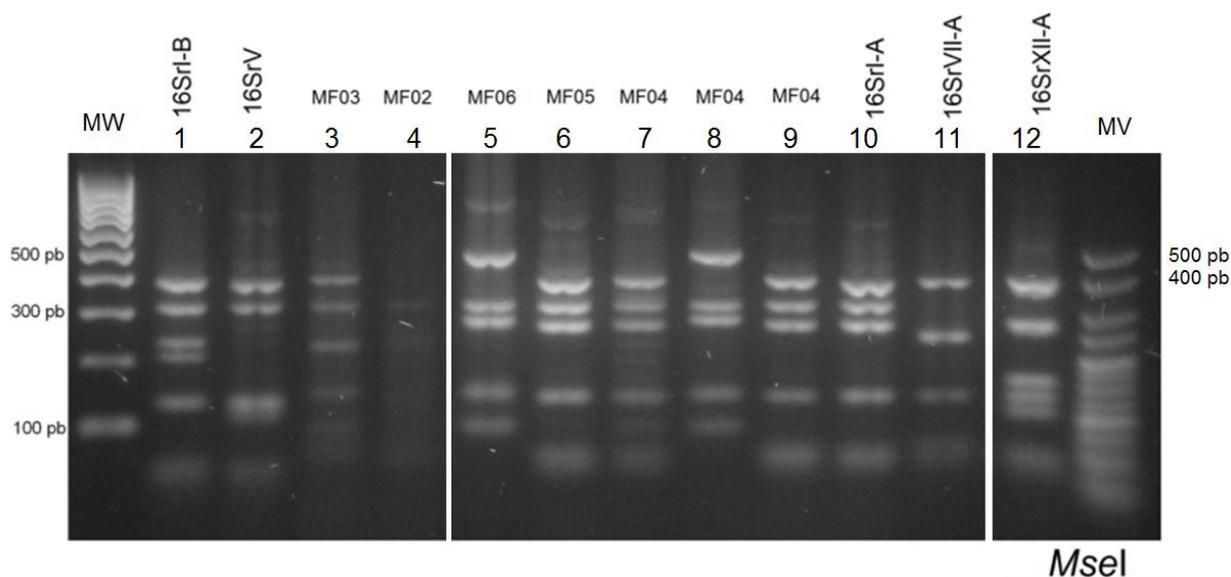


Figura 6-18. Electroforesis en gel de agarosa al 3% mostrando RFLP de amplicones obtenidos con R16F2n/R16R2 con la enzima *MseI* a partir de ADN total de insectos, se observa el perfil de restricción obtenido de fitoplasmas en diferentes cicadélidos en los carriles 3(i5), 4(i1), 5 (i3), 6 (i4), 7(i6), 8(i9) y 9 (i12). Los patrones obtenidos de ADN control se observan en los carriles 1(CA), 2 (EY1), 10 (PVM), 11 (AshY3) y 12 (BA). MW: Marcador de peso molecular HyperLadder 100bp (Bioline), MV: Marcador de peso molecular HyperLadder 25 bp (Bioline).

Los patrones de RFLP obtenidos para las diferentes morfoespecies a partir de amplicones de la región R16F2n/R26R2, se muestran en el Anexo F. Teniendo en cuenta que antes de iniciar este trabajo, sólo se conocía la presencia de fitoplasmas del grupo 16SrVII en *F. uhdei* entonces se esperaba que entre cicadélidos encontrados en sitios cercanos fueran portadores del grupo 16SrVII. Este grupo de fitoplasmas se encontró en ocho de las nueve morfoespecies evaluadas (Tabla 6-4), en la MF05 solo se observaron patrones de restricción asociados al grupo 16SrI. En las morfoespecies MF01 y MF06 se encontraron los dos tipos de fitoplasmas en un mismo individuo. Adicionalmente se encontró que en las morfoespecies MF06, MF08 y MF09 los patrones RFLP fueron muy similares al del grupo 16SrVII con la excepción de una banda adicional de 1000pb al ser observada por digestión con *AluI* (Tabla 6-4 y Anexo F). Por su parte, en la morfoespecie MF05, donde sólo se identificó el grupo 16SrI por RFLP, también se observaron algunas muestras que generaron un patrón parecido al del grupo 16SrI la presencia de una banda adicional de 1000pb al digerirse con *AluI*. En otros casos los RFLP no correspondían a los grupos 16SrVII o 16SrI (marcados como indeterminados) y se obtuvieron en amplicones a partir de las morfoespecies MF04, MF05 y MF06.

Tabla 6-4. Grupos de fitoplasmas por RFLP y secuenciación encontrados en cicadélidos de Bogotá.

Morfoespecie	ADN total	Grupo 16Sr RFLP ^a	Grupo 16Sr secuencias ^b
MF01	i20	16SrVII (2)	16Srl y 16SrVII
		16Srl y 16SrVII	
MF02	i01	16SrVII	16Srl
MF03	i05	16SrVII (2)	16Srl y 16SrVII
MF04	i38	16SrVII (3)	16Srl y 16SrVII
		Indeterminado	
	i39	16SrVII	
MF05	i59	16SrVII	16Srl y 16SrVII
		16Srl + Banda extra (1000pb) en digestión con <i>AluI</i>	
		16Srl	
MF06	i37	Indeterminado	16Srl y 16SrVII
		16Srl + Indeterminado	
		Indeterminado	
		16Srl (3)	
MF06	i35	16SrVII + Banda extra (1000pb) en digestión con <i>AluI</i>	16Srl y 16SrVII
		16SrVII	
		Indeterminado	
		16SrVII + Banda extra (1000pb) en digestión con <i>AluI</i>	
MF07	i40	16SrVII (3)	16SrVII
MF08	i44	16SrVII (2)	16SrVII
	Pool 1	16SrVII + Banda extra (1000pb) en digestión con <i>AluI</i>	
MF09	i60	16SrVII	16SrVII
		16SrVII + Banda extra (1000pb) en digestión con <i>AluI</i>	
	Pool 2	16SrVII + Banda extra (1000pb) en digestión con <i>AluI</i>	

^a RFLP con enzimas *AluI*, *MseI*, *RsaI* o *HinfI* del amplicón R16F2n/R16R2. Entre paréntesis se indica las veces que se obtuvo el mismo resultado en el análisis RFLP. Indeterminado: no corresponde a Grupo 16Srl o 16SrVII. Los resultados de electroforesis se presentan en el anexo E.

^b Información de secuencias, Anexo D, tabla D-2.

6.2 Evaluación de la capacidad de transmisión de fitoplasmas en condiciones experimentales

Inicialmente se realizaron ensayos preliminares con cicadélidos colectados en pasto sobre plantas de apio (*Apium graveolens*). *A. graveolens* se escogió porque ya se había usado como hospedero alternativo de fitoplasmas de *F. uhdei* y parecía ser un hospedero apropiado para ensayos de laboratorio (Perilla *et al.*, 2010). Se utilizaron las morfoespecies MF04 y MF05, por ser las más abundantes en las capturas realizadas en los primeros meses de 2012. Sin embargo, los cicadélidos no sobrevivieron alimentándose de *A. graveolens* y la mortalidad fue del 100% al tercer día del ensayo. Adicionalmente, en las condiciones del Campus de la UMNG en Cajicá, el tiempo de desarrollo del apio germinado desde semilla y mantenido aislado de insectos fue superior a 6 meses.

Por lo tanto se decidió evaluar la transmisión de fitoplasmas a frijol, que crece más rápido que el apio y ha sido útil en otros ensayos de transmisión (Maixner *et al.*, 2010). Los ensayos se realizaron con las morfoespecies MF04 y MF06, pues en subsiguientes muestreos el número de individuos de MF05 colectados fue muy bajo.

En los ensayos de transmisión, se usaron tanto machos como hembras de la morfoespecie MF04 (figura 6-19), pero en el caso de la morfoespecie MF06 sólo se usaron machos. Esto sucedió porque en la morfoespecie MF06 la coloración y el tamaño entre machos y hembras es diferente (figura 6-19 E y F) e inicialmente se consideraron morfoespecies distintas. Posteriormente, con ayuda del Dr. Mike Wilson (Museo de Historia Natural de Gales, Reino Unido) examinando las formas externas de la genitalia, se concluyó que corresponden a la misma morfoespecie.

Para los ensayos de transmisión se colectaron insectos en Bogotá, en pastizales ubicados en cercanías de árboles con síntomas de fitoplasmosis. Los ensayos se realizaron en nueve plantas de frijol, cinco para la morfoespecie MF04 y cuatro para la MF06, colocando 15 cicadélidos sobre cada planta. Una planta control no fue inoculada esta se mantuvo alejada de las plantas experimentales para evitar visitas no controladas de cicadélidos. Cada morfoespecie se evaluó en jaulas aparte y se hicieron dos introducciones de insectos (a la semana uno y semana tres). Los insectos usados en el ensayo de transmisión, se mantuvieron en bolsas de velo suizo lo cual facilitó su posterior recolección. A estos insectos se les realizó una posterior extracción de ADN. Se hizo un seguimiento a las plantas durante trece semanas y se colectaron muestras de hojas, tallos y raíces para posteriores análisis moleculares. Para verificar la transmisión, las plantas de frijol se evaluaron por PCR anidada, RFLP y secuenciación tres meses después de la primera introducción. En el anexo C (Tabla C-3), se listan las muestras de insectos y plantas de frijol del ensayo de transmisión.

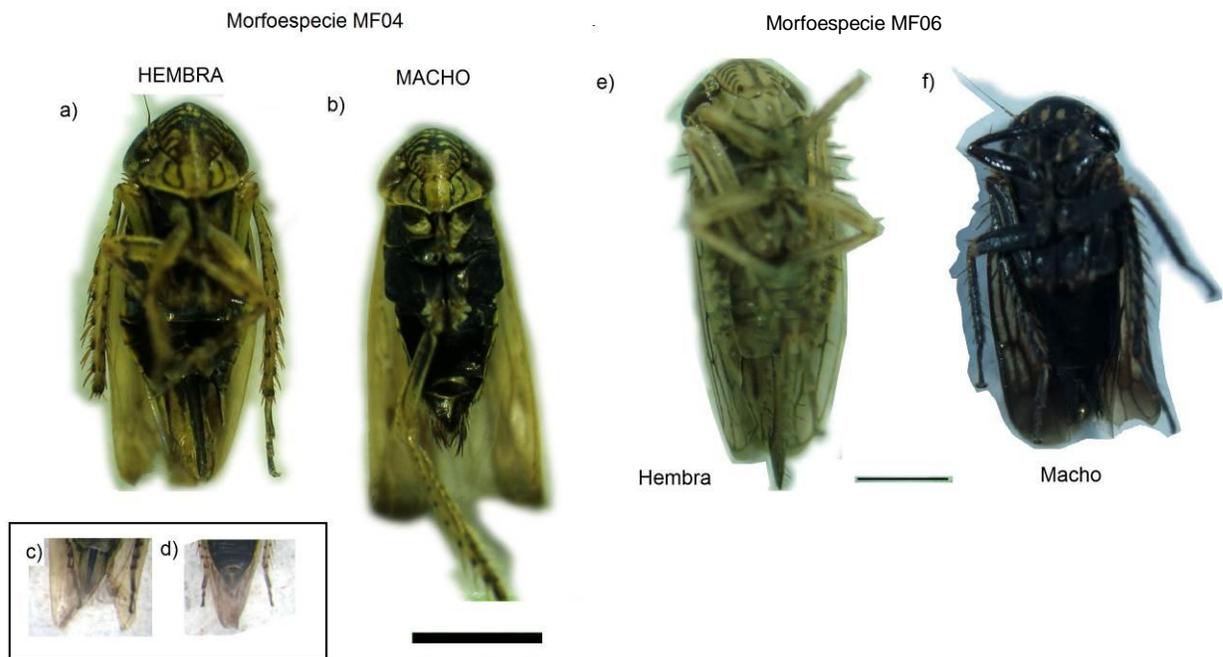


Figura 6-19. Fotografías ventrales de morfoespecies de ensayos de transmisión. **(a-d)** Morfoespecie MF04. **(e y f)** Morfoespecie MF06. Se observa la diferencia en la apariencia externa de la genitalia entre machos y hembras de la misma morfoespecie. Barra 1mm.

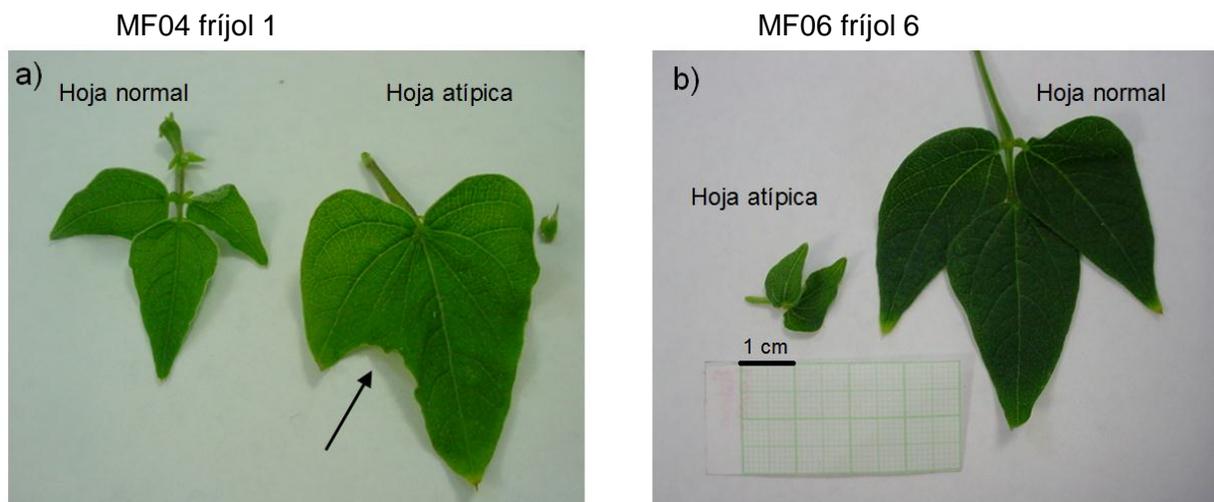


Figura 6-20. Cambios en la morfología de hojas observados en frijoles expuestos a cicadélidos. Se observa la aparición de brotes jóvenes con morfología atípica en las hojas, luego de cinco semanas de la introducción de individuos. **(a)** Hoja de frijol inoculado con MF04, la flecha señala la fusión de los foliolos lo cual modifica la hoja a hoja simple. **(b)** Hoja de frijol inoculado con MF06, la hoja pequeña se compone de dos foliolos. Normalmente las hojas compuestas del frijol tienen tres foliolos, esta morfología atípica no se observó en los brotes jóvenes de la planta testigo.

Luego de 5 semanas de la primera introducción de los insectos de las dos morfoespecies, se observó en las plantas expuestas la aparición de brotes jóvenes con hojas de formas atípicas. Estos síntomas no se observaron en la planta de frijol control. En una planta de frijol expuesta a la morfoespecie MF04, una hoja parece ser la fusión de los tres folíolos (Fig. 6-20 A), asumiendo una apariencia de hoja sencilla en lugar de compuesta. Por su parte, en una planta expuesta a la morfoespecie MF06 una hoja atípica sólo tiene dos folíolos (Fig. 6-20 B), cuando las normales presentan tres folíolos. El ADN total de insectos y plantas de los ensayos de transmisión se empleó en análisis de PCR anidada con los iniciadores P1A/P7A seguido por R16mF2/R16mR1, y posteriormente R16F2n/R16R2.

En las muestras de ADN total extraídas de cicadélidos de las morfoespecies MF04 y MF06 no se observó ningún amplicón del tamaño esperado en la reacción anidada con R16mF2/R16mR1, sin embargo, mediante la segunda amplificación anidada con R16F2n/R16R2 se obtuvieron amplicones del tamaño esperado en diferentes extractos de las dos morfoespecies (figura 6-21). Confirmando que los insectos utilizados en los ensayos de transmisión eran portadores de fitoplasmas.

Después de trece semanas desde la primera introducción de insectos, se extrajo ADN total de las plantas de frijol de los tallos y raíces y se evaluó por PCR para verificar la presencia de fitoplasmas. Los iniciadores P1A/P7A se usaron en la reacción de PCR primaria, posteriormente se amplificó con R16mF2/R16mR1 y por último con R16F2n/R16R2.

En cuatro plantas de las cinco del ensayo con la morfoespecie MF04 se detectó la presencia de fitoplasmas a las trece semanas post-introducción, por otro lado, en las cuatro plantas expuestas a la morfoespecie MF06 se obtuvieron amplicones positivos por PCR anidada. En la planta testigo no se observó amplificación en ninguna de las rondas de PCR anidada (figura 6-22).

A partir de los amplicones obtenidos con los iniciadores R16F2n/R16R2 de insectos portadores y de los frijoles, se analizaron los patrones RFLP obtenidos (anexo G) y se asoció al grupo de fitoplasmas que corresponden. En la tabla 6-5 se relacionan los resultados obtenidos por PCR anidada y el grupo 16Sr al cual pertenecían los insectos y las plantas evaluadas.

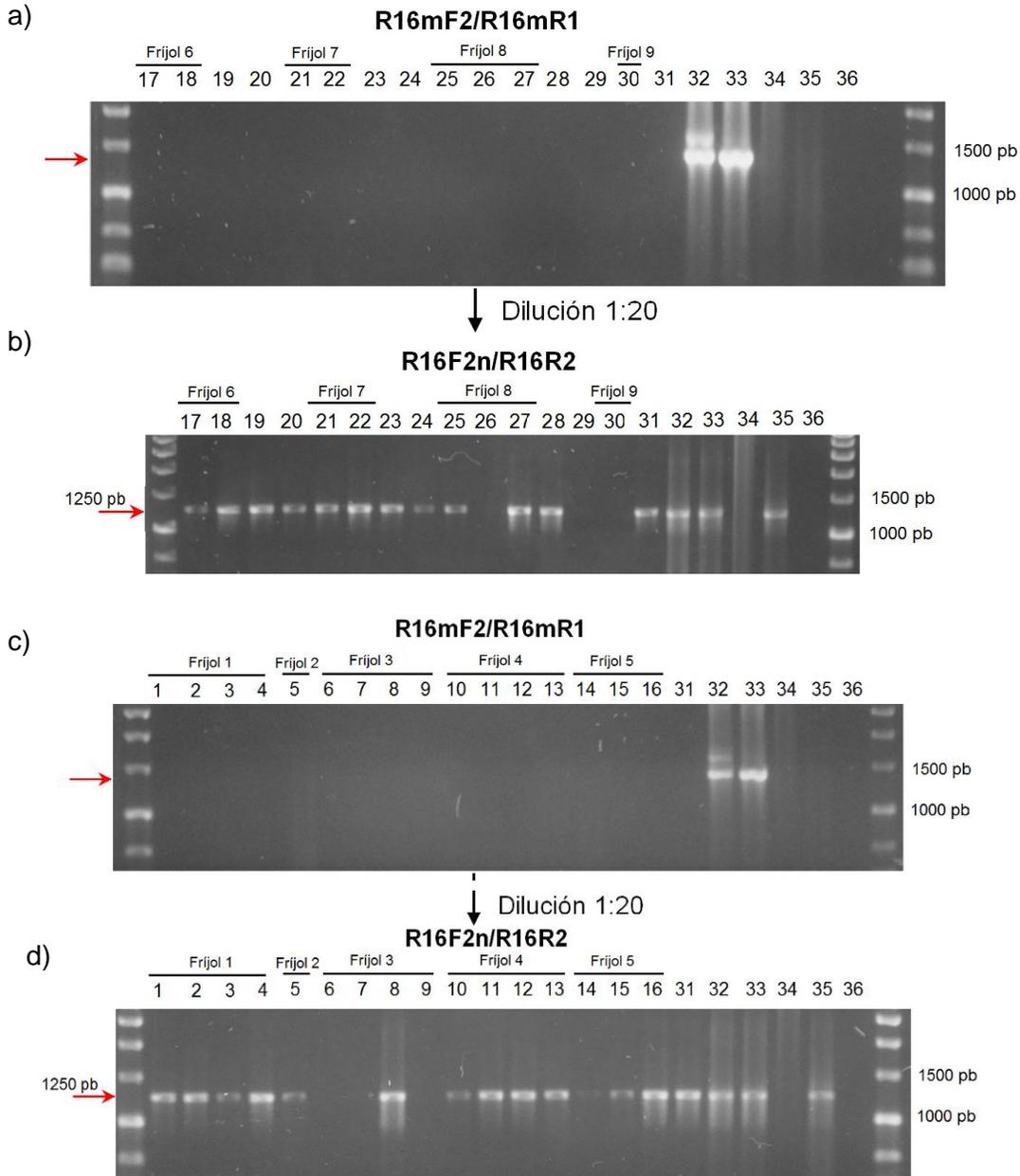


Figura 6-21. Electroforesis en gel de agarosa 1% mostrando la detección de fitoplasmas en individuos de las morfoespecies MF04 y MF06 usadas en ensayos de transmisión. **(a y b)** Detección de fitoplasmas en insectos de la morfoespecie MF04. **(c y d)** Detección en la morfoespecie MF06. En la parte superior de los carriles se señala la planta de frijol sobre la cual se colocaron los insectos. La flecha indica el amplicón del tamaño esperado. La reacción primaria se hizo con P1A/P7A. **(a y c)** Reacción anidada con R16mF2/R16mR1. **(b y d)** Segunda reacción anidada con R16F2n/R16R2. Muestras (carril:ADN total de insectos), 1:i45, 2:i50, 3:i69, 4:i70, 5:i48, 6:i46, 7:i51, 8:i71, 9:i72, 10:i47, 11:i52, 12:i73, 13:i74, 14:i49, 15:i75, 16:i76, 17:i53, 18:i67, 21:i54, 22:i68, 25:i55, 26:i65, 27:i66, 30:i56. Los carriles 19, 20, 23, 24, 28, 29 corresponden a ADN total de insectos de la morfoespecie MF06 no utilizados en los ensayos de transmisión. Carriles control, 31: ADN total i35, 32: ADN total de planta infectada con el fitoplasma MBS y 33: control positivo (AY1), 34: ADN total sin fitoplasmas, 35: ADN genómico de árbol *Croton* spp y 36: control negativo agua. El marcador de peso molecular HyperLadder 500bp (Bioline).

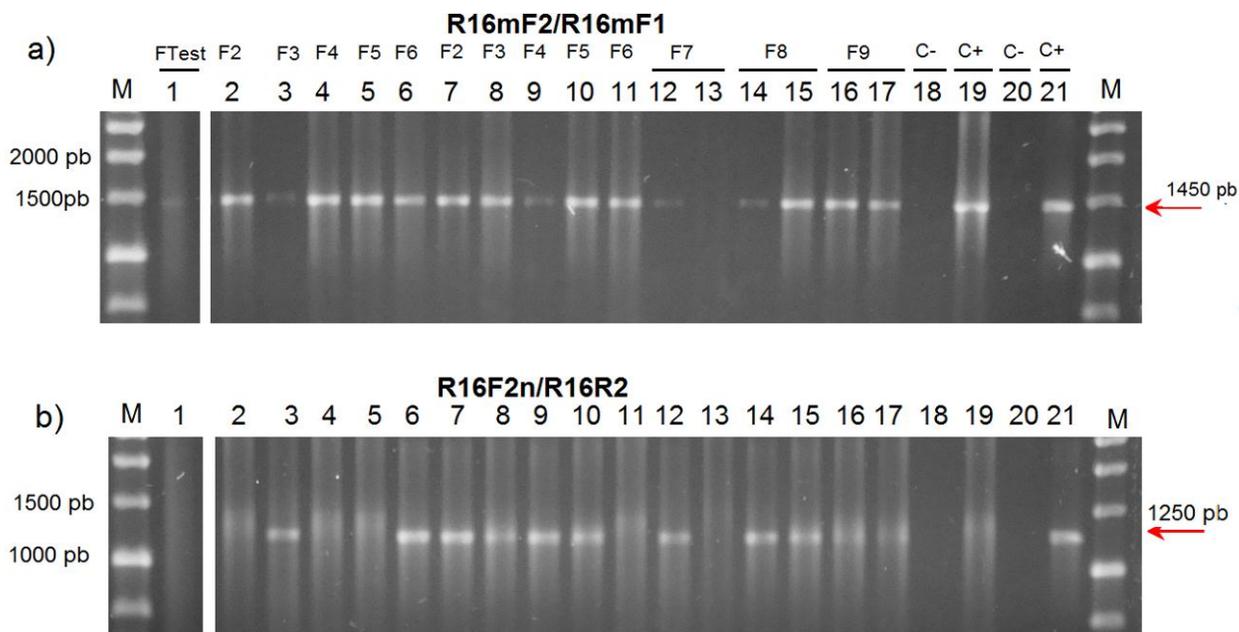


Figura 6-22. Electroforesis en gel de agarosa 1% mostrando la evaluación de la presencia de fitoplasmas en plantas de frijol expuestas a insectos de las morfoespecies MF04 y MF06, 13 semanas post-inoculación. La flecha indica el amplicón del tamaño esperado. La reacción primaria se hizo con P1A/P7A (no se muestra). **(a)** Reacción anidada con R16mF2/R16mR1. **(b)** Segunda reacción anidada R16F2n/R16R2. Muestras de ADN genómico de frijol (tabla C-3), 1: frijol testigo (TF16), frijol 2 (F2) (carril2: TF3 y 7:TF11), frijol 3 (F3) (carril 3:TF4 y 8:TF12), frijol 4 (F4) (carril4: TF5 y 9:TF13), frijol 5 (F5) (carril5:TF6 y 10:TF11), frijol 6(F6) (carril6:TF7 y 11:TF14), frijol7 (F7)(carril12:TF20 y 13:TF8), frijol8 (F8) (carril14:TF21 y 15:TF9),y el frijol 9 (F9) (carril 16:TF22 y 17:TF10). Controles positivos AY1 (carril 19) y AshY7 (carril 21); los controles negativos usados corresponden a ADN genómico sin fitoplasmas (carril18) y control agua sin ADN (carril 20). Marcador de peso molecular HyperLadder 500bp (Bioline).

En el caso de la morfoespecie MF04, se determinó que los insectos colocados sobre el frijol 1, eran portadores del grupo 16SrVII, pero en esa planta no hubo posterior detección de fitoplasmas. Los insectos introducidos sobre el frijol 2, fueron positivos para fitoplasmas del grupo 16Srl y en la planta se detectó ese mismo grupo de fitoplasmas por RFLP. En las otras dos plantas de frijol (frijol 3 y frijol 4), los insectos fueron positivos para fitoplasmas de los grupos 16Srl y 16SrVII, en tanto que en las respectivas plantas se detectaron sólo fitoplasmas del grupo 16Srl. Teniendo en cuenta la información de secuencias de los amplicones positivos, se confirman los resultados obtenidos por RFLP, aunque en dos plantas de frijol (frijol 2 y frijol 5) se detectaron además fitoplasmas del grupo 16SrVII. En cuanto al ensayo de transmisión con la morfoespecie MF06, en todos los insectos colocados sobre las plantas de frijol se detectaron por RFLP fitoplasmas del grupo 16SrVII. Sin embargo en las plantas la situación fue diferente. Por ejemplo, en los frijoles 7 y 8 se obtuvieron patrones de RFLP de los grupos 16SrVII y 16Srl, mientras que en los frijoles 6 y 9 el análisis de RFLP sólo indicó la presencia del grupo 16Srl, la información de secuencias confirmó la presencia de los grupos encontrados por RFLP en frijol (Tabla D-4).

Tabla 6-5. Ensayos de transmisión de fitoplasmas.

Evaluación	Planta	Insectos				Frijol					
		Extracto ADN total	PCR		Patrón RFLP Grupo 16Sr	Extracto ADN total	PCR			Patrón RFLP Grupo 16Sr	Información de secuencia
			mF2/mR1	F2n/R2			mF2/mR1	F2n/R2	PhyRNA2.6/3.3		
MORFO ESPECIE 04	Frijol 1	i45	-	+	VII	TF23	-	-	-	-	
		i69	-	+	VII						
		i70	-	+	VII						
		i50	-	+	VII						
	Frijol2	i48	-	+	I	TF3	+	-	-	I	16SrI
						TF11	+	-	+ (2)	I	16SrI 16SrVII
	Frijol3	i46	-	+	VII	TF4	+	+	+	I	Mala calidad
		i71	-	+	I, Ind.						
		i72	-	-		TF12	+	-	+		16SrI
		i51	-	-							
	Frijol4	i47	-	+	VII	TF5	+	+	+	I	16SrI
		i73	-	+	VII						
		i74	-	+	VII	TF13	+	+	+	I	Mala calidad
		i52	-	+	I, Ind.						
	Frijol5	i49	-	+	VII	TF6	+	+	+ (2)	I, Ind.	16SrI
		i75	-	+	VII	TF14	+	+	+ (3)	VII	16SrVII
i76		-	+								
MORFO ESPECIE 06	Frijol6	i53	-	+	VII	TF19	+	+	-	I	16SrI
		i67	-	+	VII	TF7	+	+	+	I	16SrI
	Frijol7	i54	-	+	VII	TF20	+	+	+	VII	
		i68	-	+	VII	TF8		+	+	I	
	Frijol8	i55	-	+	VII	TF21	+	+	+	VII	
		i65	-			TF9	+	+	+	I, Ind.	16SrI
		i66	-	+	VII						
	Frijol9	i56	+	-		TF22	+	+		I	16SrI
						TF10	+	+	+	I	
TESTIGO frijol 10					TF15	-	-	-			
					TF16	-	-	-			

(+) Indica muestras positivas, en paréntesis se indica el número de reacciones independientes que fueron positivas. (Ind) RFLP diferente a Grupo 16SrI o 16SrVII

6.3 Detección preliminar mediante PCR de genes potenciales en la interacción vector-patógeno.

Por otro lado, se hicieron ensayos preliminares de amplificación de los genes *secA*, que permiten una diferenciación más fina entre subgrupos de fitoplasmas (Hodgets *et al.*, 2008) y de la región que incluye genes que codifican para proteínas de membrana exclusivas de fitoplasmas, como *Imp* y *Amp*. El caso de *Amp* es particularmente interesante por su interacción diferencial con las proteínas de los microfilamentos de cicadélidos, que influyen en la habilidad de transmitir fitoplasmas en diferentes especies (Suzuki *et al.*, 2006). Con el propósito de obtener secuencias de genes no ribosomales, se hicieron ensayos empleando iniciadores que habían sido previamente reportados por otros autores para establecer las condiciones de amplificación con las muestras de ADN total de plantas e insectos que incluyen ADN de fitoplasmas.

Para amplificar por PCR la región comprendida entre los iniciadores ES-1/Nad-2 y Rnc-1/PssA1, en primer lugar se buscó establecer las condiciones de amplificación usando como ADN molde el ADN de plantas infectadas con grupos conocidos de fitoplasmas (Tabla 5-5). Se evaluaron diferentes temperaturas de anillamiento (50°C, 55°C, 58°C y 60°C), dos perfiles térmicos diferentes (perfil B y C figura 5-5) y tres concentraciones diferentes de cloruro de magnesio (1,5 mM, 2.5mM y 3.5mM MgCl₂). Se obtuvieron amplicones de 500pb en lugar de 5000 pb como se esperaba a partir del ADN control de grupos de fitoplasmas como BA y MBS con los iniciadores Rnc-1/PssA1, con condiciones de 1,5 mM y 2,5 mM de MgCl₂, a 50°C de temperatura de anillamiento con el perfil de térmico B o con el perfil térmico C. Del fragmento obtenido a partir de MBS se obtuvo una secuencia legible, que según análisis blastx, presenta identidad del 92% con una ribonucleasa dsRNA de fitoplasmas (Accesión YP456339.1, Cobertura 27% y valor E de 3 e⁻³⁰) (Anexo H). Cuando se evaluaron muestras de ADN de cicadélidos portadores de fitoplasmas no se obtuvieron amplicómeros del tamaño esperado.

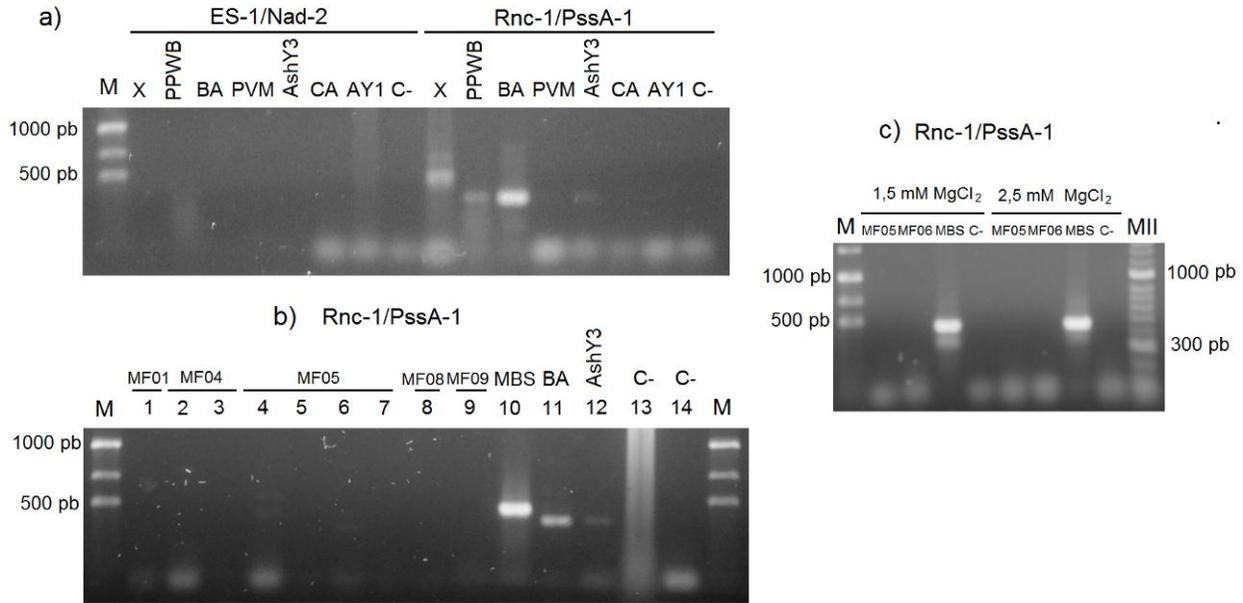


Figura 6-23. Electroforesis en gel de agarosa al 1% mostrando PCR con iniciadores ES-1/Nad-2 y Rnc-1/Pssa1. **(a)** Amplificación PCR con ES-1/Nad-2 (Tamaño esperado 3,6Kb) y Rnc-1/Pssa-1 (Tamaño esperado 5Kb), temperatura de anillamiento 50°C, 1,5 mM MgCl₂ y perfil de amplificación B. **(b)** Evaluación de amplificación a 2,5mM MgCl₂, perfil de amplificación C sobre muestras de cicadélidos (1:i:20, 2:Pool3, 3:i:38, 4: Pool4, 5: i:37, 6:Pool5, 7: i:35, 8: Pool1, 9: Pool2) **(c)** Evaluación de dos concentraciones de MgCl₂ con el perfil térmico C, extractos de ADN total de cicadélidos de la morfoespecie MF5 (Pool4) y de MF06 (Pool5). M: Marcador de peso molecular HyperLadder 500pb (Bioline), MII: Marcador de peso molecular HyperLadder 50pb (Bioline).

Los ensayos de amplificación del gen *secA*, se realizaron inicialmente en el laboratorio del Dr. Mathew Dickinson (The University of Nottingham, Inglaterra) con los reactivos, iniciadores y condiciones de amplificación con las que se han obtenido las secuencias de *secA* de fitoplasmas mantenidos en plantas de referencia. En estos ensayos los iniciadores SecAR3/SecAF1 se usaron en la reacción primaria, la cual según lo estandarizado genera un amplicón de 840 pb (figura 6-24 A), y a partir de una dilución se realizó una PCR anidada con los iniciadores SecAF5/SecAR2, los cuales generan un amplicón de 600 pb. La secuencia del producto de la reacción anidada, es útil en análisis filogenéticos para diferenciar subgrupos de fitoplasmas. Pero, en los ensayos realizados en el laboratorio del Dr. Dickinson con las muestras de insectos y plantas infectadas con fitoplasmas de Bogotá, no se generaron amplicones en las muestras, pero sí en los controles positivos (figura 6-24). Por ello posteriormente, se evaluaron en el laboratorio de la UMNG diferentes concentraciones de MgCl₂, temperaturas de anillamiento y ciclos de amplificación completando un total de 13 ensayos y evaluando todas las muestras de ADN total obtenidas en Bogotá. Sin embargo, tampoco se obtuvieron amplicones en la reacción anidada para la región SecAF5/SecAR2.

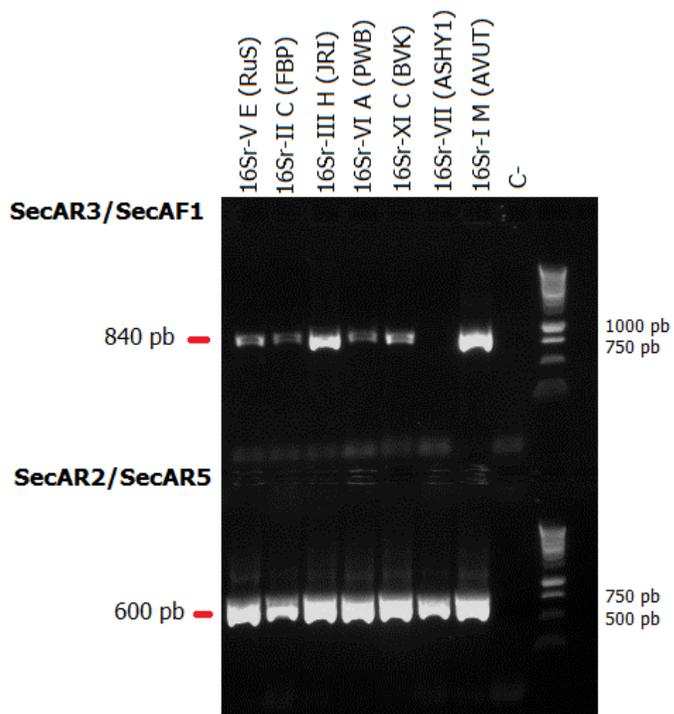


Figura 6-24. Electroforesis en gel de agarosa al 1% mostrando la evaluación de amplificación del gen *SecA*. **(a)** Reacción primaria SecAR3/SecAF1. **(b)** Reacción anidada SecAF5/SecAR2. El ADN control vegetal corresponde a diferentes grupos de fitoplasmas

7.DISCUSIÓN

El objetivo de este trabajo era identificar potenciales insectos vectores de fitoplasmas dentro de la familia Cicadellidae, presentes en Bogotá. Dado el impacto negativo que los fitoplasmas tienen en la actualidad en los árboles de la ciudad, es importante conocer los insectos vectores responsables de la dispersión del patógeno en el área y que parecerían estar llevando el patógeno a las afueras de la ciudad afectando cultivos y plantas ornamentales de la región. A la fecha, los insectos vectores de los fitoplasmas del grupo 16SrVII no se conocen en las áreas de ocurrencia (Hill y Sinclair, 2000; Franco-Lara y Filgueira, 2004). Por otro lado, vectores de fitoplasmas del grupo 16Srl se conocen en Estados Unidos y Europa. Algunos vectores son compartidos por los subgrupos 16Srl-A, 16Sr-B y 16Srl-C y los principales vectores del grupo son cicadélidos de los géneros *Macrosteles* spp., *Euscelis* spp., *Scaphytopius* spp. y *Aphrodes* spp. (Lee *et al.*, 2004). Debido al desconocimiento que hay sobre la familia Cicadellidae en Colombia, no se sabe si especies de estos géneros existen en Bogotá y si son capaces de transmitir fitoplasmas. A pesar de que no era un propósito explícito de este proyecto, este trabajo contribuye al conocimiento de los Cicadellidae de Bogotá y abre una posibilidad de estudio de este grupo.

De acuerdo a la información del Jardín Botánico de Bogotá José Celestino Mutis, en el Censo del Arbolado Urbano (2007), de un total aproximado de 460.000 árboles en áreas públicas existentes en la ciudad, *F. uhdei* representa cerca de 23131 individuos, lo que lo hace una especie predominante en la composición del arbolado de Bogotá. Síntomas sugerentes de fitoplasmas comenzaron a observarse en árboles de otras especies que crecían en las cercanías de *F. uhdei* y en ensayos anteriores se hicieron esfuerzos por coleccionar cicadélidos de árboles con síntomas, con resultados muy pobres. Por esta razón, en este trabajo se tomaron muestras de insectos en zonas de pastizales como separadores y zonas verdes, donde la especie predominante es *Pennisetum clandestinum* (figuras 6-2, 6-3 y 6-4). Además se estudió la presencia de fitoplasmas en las especies *Croton* spp., *Pittosporum undulatum* y *Populus nigra* que crecen en cercanías de árboles de *F. uhdei*. En el arbolado urbano de Bogotá *P. undulatum*, con una población aproximada de 30725 árboles es una de las especies de mediano porte más abundantes. Por su parte las especies del género andino *Croton*, representadas en aproximadamente 3600 individuos, son apreciadas por su belleza ornamental y porque produce metabolitos secundarios que se emplean como medicamentos caseros. La especie *P. nigra* es una especie introducida, con aproximadamente 300 individuos en el arbolado de Bogotá.

Antes de comenzar este trabajo, había reportes de fitoplasmas del grupo 16SrVII en especies del género *Fraxinus* de Estados Unidos (Griffiths *et al.*, 1999) y Colombia (Figueira *et al.*, 2004), en la especie *Hypericum perforatum* en Italia (Bruni *et al.*, 2005), en alfalfa en Argentina (Conci *et al.*, 2005) y en las especies *Ugni molinae* y *Paeonia lactiflora* en Chile (Arismendi *et al.*, 2011). En este trabajo, se reporta por primera vez el grupo 16SrVII en *Croton* spp. (figura 6-17) y en *P. nigra* (figura E-1 y tabla D-1) en Bogotá.

Por otro lado, el grupo de fitoplasmas 16SrI se asocia con más de 100 enfermedades importantes de plantas en todo el mundo y representa el grupo de fitoplasmas más diverso y ampliamente distribuido a nivel mundial (Marcone *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2004; Bertaccini, 2007; Bertaccini y Duduk, 2009; Mitrovic *et al.*, 2011). El grupo de fitoplasmas 16SrI se reporta por primera vez infectando una especie del género *Fraxinus* (figura 6-12) y en árboles sintomáticos de *P. nigra*, *P. undulatum* y *Croton* spp. (figura 6-12), lo que constituye un primer reporte de estos patógenos en estas especies para Colombia. Por ello, la infección de fitoplasmas del grupo 16SrI sumado al desconocimiento de los agentes de dispersión natural en la zona, representan un riesgo fitosanitario para la región. A nivel mundial existen reportes de por lo menos 30 especies de insectos vectores, frecuentemente polípagos (Hogenhout *et al.*, 2008) que dispersan el grupo 16SrI de fitoplasmas y causan infecciones en más de 80 especies de interés comercial (Firrao *et al.*, 2007 citado en Hogenhout *et al.*, 2008) como zanahoria, lechuga, papa (Lee *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2006) y otros que también se cultivan en la Sabana de Bogotá.

Hasta donde sabemos, los resultados obtenidos de infección de fitoplasmas del grupo 16SrI en *P. undulatum* y *Croton* spp. es un reporte nuevo de este patógeno para las dos especies de árboles. En la especie *P. undulatum* no se encontraron fitoplasmas del grupo 16SrVII pero sí del grupo 16SrI. Por su uso ornamental *P. undulatum* tiene amplia distribución a nivel mundial, pero hasta el momento no se habían reportado fitoplasmas en otros países.

En el caso del género *Croton* además de los fitoplasmas encontrados en este trabajo, se presentan otros problemas fitosanitarios causados por lepidópteros del género *Sangalopsis*⁴ que producen daño directo por herbivoría. Los síntomas descritos en los individuos evaluados (figura 6-4) no se relacionan con la presencia de lepidópteros. En árboles localizados en el campus de la Universidad Nacional (Área Teusaquillo) se observaron coronas transparentes y entorchamiento de hojas (figura 6-4 C y D), en otros individuos localizados en el *Park Way* (Área Teusaquillo) y las calles 82 y 94 (Área Chicó), se observaron rebrotes anormales (figura 6-4 A y B) causados por la activación anormal y simultánea de los meristemos del tronco así como la formación de hojillas que cubren el tronco y las ramas de los árboles afectados.

⁴Jardín Botánico José Celestino Mutis, Informe de Gestión 31 Diciembre 2010.

Las diferencias en la expresión de síntomas podrían deberse a diferencias en el tiempo de la colonización de fitoplasmas en estos árboles, lo cual requeriría evaluar experimentalmente si los síntomas leves (como entorchamiento de hojas y defoliación de las coronas) se asocian con el inicio de la infección y los síntomas severos (como rebrotación y presencia de “hojillas”) con estados más avanzados. Es importante resaltar que en Bogotá existen por lo menos tres especies diferentes del género *Croton* spp. que se conocen con el nombre común de sangregado y presentan diferencias en el tamaño, forma de las hojas y su porte. La identificación de las muestras de *Croton* evaluadas no se llevó a nivel de especie y es necesario estudiar la expresión diferencial de síntomas en estas especies de forma más sistemática.

En *P. nigra* se observaron alteraciones drásticas de la corona en todos los individuos encontrados en las áreas de muestreo. En Europa, se han reportado fitoplasmas del grupo 16Srl en diferentes especies del género *Populus* como *P. tremula*, *P. nigra* y *P. alba* (Berges *et al.*, 1997; Seruga *et al.*, 2003) y se conocen dos especies de vectores de la subfamilia Idiocerinae asociados con esta enfermedad (Weintraub y Beandland, 2006). Sin embargo, análisis de secuencia y RFLP *in silico* de los fitoplasmas de *Populus nigra* reportados en este trabajo (JQ730859), sugieren que se trata de un subgrupo diferente al que existe en Europa, el cual es el subgrupo 16Srl-P (Mitrović *et al.*, 2011).

Los síntomas observados en árboles que incluyen cambios dramáticos en la arquitectura de la corona, brotes epicórmicos y crecimiento anormal vegetativo permitieron seleccionar árboles en los que se detectaron fitoplasmas. Los daños observados indican el mal estado sanitario de los árboles de la ciudad, lo que tiene consecuencias ambientales porque afectan la función ornamental, económicas al considerar los costos de posibles tratamientos a los individuos afectados o de erradicación en caso de requerirse. Dado el altísimo número de árboles afectados en la ciudad, además existen consecuencias epidemiológicas porque supone un riesgo de dispersión a otras especies ornamentales y de interés comercial en la ciudad y sus alrededores. No se conoce cuál sea el efecto individual de los dos grupos de fitoplasmas encontrados en los árboles, y probablemente la expresión de síntomas también dependa de la presencia de infecciones mixtas de fitoplasmas del grupo 16SrVII y 16Srl.

En cuanto a los grupos y subgrupos de fitoplasmas encontrados en los árboles de Bogotá, en *P. undulatum* (secuencia JQ73086) se encontró el grupo 16Srl-B pues de acuerdo al análisis de RFLP *in silico* (conforme a los parámetros de *iphyclassifier*), el patrón era idéntico al de la secuencia de referencia (NC 005303). Las secuencias de la región R16F2n/R2 asociadas a fitoplasmas de *F. uhdei*, *Croton* spp. y *Populus nigra* (JQ730859, JQ730859 y JQ730861) correspondieron a secuencias del grupo 16Srl, pero no fue posible asignar el subgrupo al cual pertenecen con la comparación de RFLP *in silico*, debido a que presentaron coeficientes de similitud menores o iguales a 0.97, lo que sugiere que podrían corresponder a una nueva variante al interior del grupo 16Srl. Determinar apropiadamente el tipo de fitoplasmas encontrados en Bogotá, es relevante teniendo en cuenta que fitoplasmas pertenecientes a diferentes subgrupos dentro de un mismo grupo 16S rRNA pueden causar diferentes enfermedades de plantas (Davis y Sinclair, 1998; Lee *et al.*, 1998; Duduk y Bertaccini, 2011) y pueden ser transmitidos por

diferentes vectores (Weintraub y Beanland, 2006).

Los grupos taxonómicos de hemípteros que se han descrito como vectores de fitoplasmas son diversos, este estudio se delimitó en la familia Cicadellidae (Hemiptera, Auchenorrhyncha), en la cual se han reportado la mayoría de vectores de fitoplasmas (Weintraub y Beanland, 2006; Wilson y Weintraub, 2007). Este trabajo incluyó el análisis de fitoplasmas en nueve especies de la familia Cicadellidae colectadas en Bogotá, que incluían miembros de las subfamilias Deltocephalinae, Typhlocybiniae y Xestocephalinae, la diferenciación de los cicadélidos capturados se basó en las características morfológicas externas y los patrones de pigmentación de adultos. Con la colaboración del Dr. Mike Wilson (Museo de Historia Natural de Gales, Reino Unido) y Juan Manuel Vargas (ICA, Colombia), se verificaron las morfoespecies y se reconocieron las hembras y machos de la misma morfoespecie, pero la identificación taxonómica de estos ejemplares se encuentra en proceso.

En las nueve morfoespecies de cicadélidos la presencia de fitoplasmas se evaluó entre 1 y 69 individuos dependiendo del número de capturas, por PCR anidada, RFLP y secuenciación (Tablas 6-2 y 6-4, figura 6-13) y se detectó la presencia de fitoplasmas en las nueve morfoespecies. De cada una de las morfoespecies de cicadélidos encontrados en las áreas de estudio, se obtuvieron amplicones del tamaño esperado de la región 16S rRNA con los iniciadores R16F2n/R16R2, fU5/rU3 o PhyRNA2.6/PhyRNA3.3 en reacción anidada (Tabla 6-2). La observación de amplicones del tamaño esperado, dependió en parte, de los juegos consecutivos de iniciadores utilizados en PCR anidada y por ello fué necesario evaluar diferentes combinaciones de iniciadores en la reacción primaria, anidada o incluso realizar una segunda PCR anidada en algunas muestras.

A partir de los iniciadores fU5/rU3, PhyRNA3.3/PhyRNA2.6 o R16F2n/R16R2 se obtuvieron 28 secuencias de fitoplasmas (Anexo 4B) de regiones del gen 16S rRNA en cicadélidos. El juego de iniciadores fU5/rU3 parece amplificar preferencialmente fitoplasmas del grupo 16Srl, como se constató por secuenciación (figura 6-13 y tablas D-1 y D-2). Los iniciadores PhyRNA3.3/PhyRNA2.6, preferencialmente generaron secuencias de fitoplasmas del grupo 16SrVII lo cual puede dar una idea rápida de la presencia o no de estos fitoplasmas en las muestras de la Sabana de Bogotá. En cualquier caso es necesario verificar por secuenciación o por RFLP.

Con los iniciadores R16F2n/R16R2 sólo se obtuvieron dos secuencias completas de esta región de los fitoplasmas en la morfoespecie MF04, las cuales se relacionan con fitoplasmas del grupo 16Srl. A pesar de que no se obtuvieron secuencias completas de la región R16F2n/R16R2 del grupo 16SrVII en muestras de insectos y plantas, el análisis de PCR anidada, RFLP y secuenciación con otros iniciadores, permitieron detectar el grupo 16SrVII.

La combinación de información obtenida por secuencias y RFLP de fitoplasmas, permitieron concluir que en tres morfoespecies (M07, MF08 y MF09) se encontró sólo la infección de fitoplasmas del grupo 16SrVII y en seis morfoespecies (MF01 a MF06) la infección con los grupos 16SrVII y 16Srl. Entre ellas, en las morfoespecies MF01, MF02,

MF03 y MF06 los dos grupos de fitoplasmas se encontraron en un mismo individuo mientras que en las morfoespecies MF04 y MF05 en diferentes individuos se detectaron los fitoplasmas del grupo 16SrVII o 16SrI. La existencia de infecciones mixtas en la misma planta o insecto, explicarían porqué con frecuencia se obtenían secuencias de mala calidad que impedían hacer los análisis bioinformáticos. En contra de lo esperado, se detectaron fitoplasmas en todas las morfoespecies evaluadas, sin embargo cabe recordar que el hecho de que los fitoplasmas estén presentes en los insectos no garantiza que sean transmitidos y por esto es necesario hacer las pruebas de transmisión para demostrar si son o no vectores. Se supone que existe cierto grado de especificidad en las relaciones entre fitoplasmas y los insectos vectores (Fletcher *et al.*, 1998) o entre los fitoplasmas y sus hospederos vegetales, dado que estas relaciones implican interacciones de reconocimiento y respuesta, en procesos coevolutivos (Howe y Jander, 2008; Nadarajah y Stavrinides, 2011) pero establecer estas relaciones en el patosistema de Bogotá, requiere trabajo adicional.

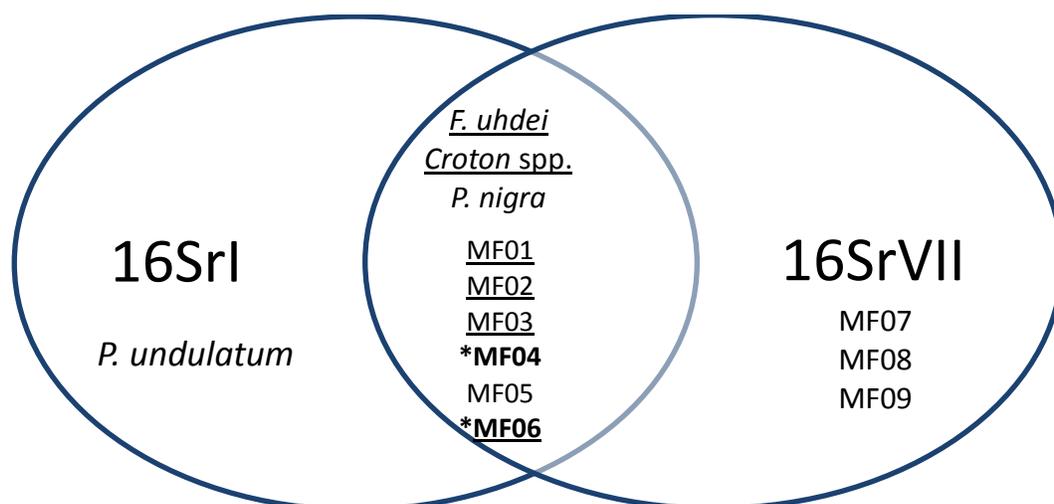


Figura:

La existencia de infecciones mixtas también se presentó en árboles. Resultados de RFLP y secuenciación mostraron que en dos casos, los árboles afectados de *Croton sp.* y *P. nigra* presentaban mezclas de los dos grupos de fitoplasmas (figura 6-17 y figura E-1), estas mezclas se presentaron en un mismo individuo, por ejemplo, a partir de una muestra de *Croton spp.* (ADN 33), se obtuvo la secuencia JQ730861 del grupo 16SrI (figura 6-13), secuencias PhyRNAF3.3/PhyRNA2.6 del grupo VII (figura E-1) y a partir del producto de PCR con R16F2n/R16R2, un patrón RFLP del grupo 16SrVII (figura 6-17).

La coexistencia de dos grupos diferentes de fitoplasmas en un mismo individuo o en una misma especie vegetal plantea varias preguntas relacionadas con la biología de los vectores, pues de los insectos depende la transmisión de uno o más fitoplasmas a una planta susceptible (Lee *et al.*, 1998). Entonces, surgen varios interrogantes: ¿cuál de los fitoplasmas se estableció en primer lugar?, ¿el tiempo que lleva la infección de fitoplasmas puede representar en alguna medida la diferencia en síntomas observados

entre árboles de diferentes zonas de la ciudad?, ¿el rango de hospederos de los fitoplasmas, se afecta cuando hay mezclas de ellos?, ¿es posible que haya cambiado el rango de los fitoplasmas del grupo 16SrVII, siendo ahora más cosmopolita por la presencia del grupo 16Srl?, ¿se afecta la transmisión por la presencia de dos o más grupos de fitoplasmas?, ¿qué factores ambientales o biológicos han influenciado en la dinámica poblacional de los vectores, en la fisiología de las plantas o en los fitoplasmas, haciendo de esta una enfermedad emergente en Bogotá? o ¿se aceleran los procesos evolutivos en poblaciones en las que hay mezclas de fitoplasmas?.

Los reportes de infecciones mixtas de fitoplasmas se asocian en lugares donde la agricultura es intensiva y hay múltiples cultivos (Lee *et al.*, 1998) y se ha explorado poco la diversidad de poblaciones de fitoplasmas en hospederos individuales (Nicolaisen *et al.*, 2011), en parte, porque se detectan por RFLP de productos de PCR 16S rRNA y la interpretación de los patrones puede ser compleja (Hodgetts *et al.*, 2007). En el caso de Bogotá, en la ciudad hay una alta diversidad de especies vegetales herbáceas, rastreras, de pastos, frutales y maderables, que en conjunto forman el patrimonio ambiental de la ciudad. En la actualidad no se conoce cuáles de estas plantas son susceptibles o no a fitoplasmas. La fuente de inóculo original de los fitoplasmas de ambos grupos no se conoce y posiblemente en algunas muestras evaluadas en el presente trabajo se encuentren otros grupos de fitoplasmas aún no determinados, sin embargo, es claro que este fenómeno requiere de la participación de los vectores. La mayoría de vectores conocidos en grupos como 16Srl (Aster yellows) y 16SrlII (X-disease) son polípagos (Lee *et al.*, 1998), y pueden pasar diferentes estadios de su ciclo de vida en hospederos distintos o alimentarse de varios hospederos, lo cual implica interacciones multihospederos y la oportunidad de establecer nuevos nichos ecológicos. Aunque no conocemos si se alimentan de hospederos leñosos, las dos especies de cicadélidos vectores de fitoplasmas 16Srl y 16SrVII en Bogotá, encontrados en este trabajo, son polípagos puesto que se alimentaban de pasto y de frijol, con lo cual es de esperarse que diferentes especies vegetales a las aquí evaluadas, estén infectadas con fitoplasmas; pero no se conoce la extensión del área geográfica de ocurrencia.

Teniendo en cuenta el complejo panorama de relaciones ecológicas en el patosistema fitoplasmas-hospederos y vectores de Bogotá, la información obtenida en este trabajo sobre insectos portadores de fitoplasmas permitirá establecer futuras líneas de trabajo que busquen resolver alguno de estos interrogantes planteados.

Como se mencionó anteriormente, establecer que un insecto es vector de fitoplasmas, requiere la demostración experimental de su capacidad de transmisión. En la mayoría de los reportes, la transmisión se hace partiendo de crías de cicadélidos que se han mantenido por varias generaciones sobre plantas libres de fitoplasmas. Los ensayos de transmisión consisten en permitir la alimentación de un grupo de insectos adultos sanos, sobre plantas infectadas con fitoplasmas como *C. roseus* y posteriormente inocular experimentalmente plantas sanas con los insectos portadores del fitoplasma de estudio (Batle *et al.*, 2007). Así también es posible determinar experimentalmente los parámetros biológicos de la transmisión de fitoplasmas como el tiempo de adquisición, el

periodo de latencia y el periodo de inoculación (Carraro y Ermacora, 2001; Arocha *et al.*, 2005; Mayer *et al.*, 2010). Sin embargo, esto supone conocer el ciclo de vida del vector o por lo menos, definir hospederos en los cuales se puedan establecer crías.

En este trabajo no se partió de crías de insectos porque no se conocen los hospederos vegetales en los cuales los cicadélidos de Bogotá completan su ciclo de vida. Una alternativa hubiera podido ser el hacer ensayos de transmisión sobre plantas jóvenes de *F. uhdei*, *P. undulatum*, *P. nigra* o *Croton* spp. pero por razones prácticas es difícil y demorado conseguirlas, pues habría que germinarlas a partir de semillas y esto puede tomar años, así como mantenerlos en invernaderos apropiados para este tipo de ensayos. Entonces se decidió utilizar insectos provenientes de pastizales situados cerca de árboles con síntomas de fitoplasmas, pues tampoco fue posible colectarlos directamente sobre árboles de interés como *F. uhdei* o *P. undulatum*.

En el presente trabajo se realizaron los ensayos evaluando la capacidad de transmisión de fitoplasmas de las dos morfoespecies más abundantes encontradas en el momento de los muestreos, empleando una metodología previamente reportada que permitió identificar en Europa la especie *Macropsis mendax* como vector de “Elm yellows phytoplasma” (Grupo 16Sr-V) (Carraro *et al.*, 2004), donde se evaluó la transmisión a plantas sanas con insectos colectados en campo.

Por reportes anteriores se conoce que los vectores no son necesariamente las poblaciones más abundantes de insectos portadores de fitoplasmas (Weintraub y Beanland, 2006). Pero, un factor limitante en la realización de ensayos de transmisión es la cantidad de insectos que deben usarse para asegurarse que estén presentes los insectos infectados (Tanne *et al.*, 2001). En el caso estudiado, no se contaba con información previa de los hospederos vegetales, el ciclo de vida de los cicadélidos, o de datos sobre proporción de insectos infectados con fitoplasmas. Por ello, el criterio de selección de las dos morfoespecies evaluadas fué la abundancia de individuos, más aún considerando que la cantidad de insectos empleados en los ensayos de transmisión debe ser alta para descartar que la ausencia de transmisión se deba a un bajo número de insectos infectados (Carraro y Ermacora, 2001).

En los ensayos realizados en este trabajo, se escogió fríjol (*Vicia faba*) como hospedero vegetal, por su porte arbustivo, rápido crecimiento y porque es un hospedero apropiado para diferentes especies Auchenorrhyncha (Maixner *et al.*, 2010). Hay que tener en cuenta que puede haber casos de insectos que siendo vectores, no transmiten fitoplasmas debido a factores como que la especie vegetal no sea hospedero de los insectos, la no susceptibilidad a fitoplasmas de la planta experimental, periodos de latencia largos en el insecto o transmisión intermitente (Carraro y Ermacora, 2001).

En las dos morfoespecies evaluadas, se observó que los insectos se morían aproximadamente las dos semanas de la introducción en fríjol. En las plantas de fríjol expuestas a los individuos de la morfoespecie MF04, entre los que habían machos y hembras (figura 6-20 A-D), no se observaron huevos sobre el material vegetal recolectado, lo que sugiere que estos insectos no completan su ciclo de vida en fríjol.

Como en los ensayos de transmisión con la morfoespecie MF06 sólo se introdujeron machos, era de esperarse que no hubiera huevos.

Aproximadamente a las dos semanas, post-inoculación, los insectos muertos se recogieron de las plantas de frijol. La presencia de fitoplasmas fue confirmada en las dos morfoespecies de insectos en la segunda PCR anidada (figura 6-21), lo que sugiere que los fitoplasmas estaban en muy baja concentración.

A partir de la quinta semana desde la primera introducción de insectos de las dos morfoespecies, se comenzaron a observar en las plantas de frijol síntomas atribuibles a la infección por fitoplasmas, tales como alteración en los patrones fenológicos de los órganos vegetativos, es decir, hojas simples en vez de compuestas u hojas deformes (figura 6-20 A y B). Según Maixner *et al.*, 2010, entre cuatro y seis semanas es el periodo estimado para la manifestación de síntomas en frijol (*Vicia faba*) en ensayos de transmisión de fitoplasmas con insectos.

En la semana 13 se realizó un muestreo destructivo, del cual se obtuvieron extractos de ADN total de las plantas de frijol (tejido vascular del tallo y raíces). Cuando se realizaron las PCR anidadas para detectar fitoplasmas, en la primera reacción anidada con R16mF2/R16mF1 se observaron amplicones del tamaño esperado en ocho de las nueve plantas de frijol expuestas a las dos morfoespecies (figura 6-22). Posteriormente, se compararon las secuencias (Anexo H) y patrones RFLP de la región R16F2n/R16R2 en los insectos usados en los ensayos de transmisión respecto a los frijoles inoculados con estos insectos.

En la morfoespecie MF04 antes de la transmisión, se detectaron fitoplasmas de los grupos 16Srl, 16SrVII y posiblemente otros grupos aún no determinados; los cuales al alimentarse de los frijoles, transmitieron fitoplasmas del grupo 16Srl y 16SrVII (Tabla 6-5). Lo anterior sugiere que la morfoespecie MF04 es vector de los grupos 16Srl y 16SrVII, pero aparentemente es más eficiente transmitiendo el grupo 16Srl que el grupo 16SrVII, aunque se requiere un experimento con mayor número de plantas para confirmar esta observación. Cuando un vector puede adquirir más de un grupo o cepa de fitoplasmas el patrón de transmisión depende de la competencia entre los fitoplasmas y posiblemente, de las diferencias del tiempo de latencia, caso en el cual el fitoplasma con menor tiempo de latencia podría ser transmitido con más eficiencia (Bosco y D'Amelio, 2010), por ello se puede inferir que en MF04, el periodo de incubación de los fitoplasmas 16Srl es menor que el de los fitoplasmas del grupo 16SrVII. En cuanto a la morfoespecie MF06, en los insectos usados en la inoculación, se detectó por RFLP fitoplasmas del grupo 16SrVII. En dos de las cuatro plantas inoculadas con la morfoespecie MF06 se encontraron fitoplasmas del grupo 16Srl y en las otras dos plantas se detectaron tanto fitoplasmas del grupo 16Srl como del grupo 16SrVII en una misma planta (Tabla 6-5). Esto indica que esta especie de cicadélidos también puede transmitir fitoplasmas de los grupos 16Srl y 16SrVII. En ambos casos se requiere determinar experimentalmente los parámetros biológicos de la transmisión, los cuales dependen de la interacción de cada fitoplasma con cada especie de vector (Bosco y D'Amelio, 2010).

Esos resultados son la primera evidencia de la capacidad de transmisión de fitoplasmas de los cicadélidos de las morfoespecies MF04 y MF06. Además, muestran que las dos morfoespecies, tienen la capacidad de transmitir fitoplasmas del grupo 16SrVII. Este sería el primer reporte de vectores para el grupo 16SrVII, que está reportado en Norteamérica (Griffiths *et al.*, 1999) pero donde no se conoce su insecto vector (Hill y Sinclair, 2000). Sería importante determinar si cicadélidos del mismo género o especie se encuentran en Norteamérica en los ecosistemas en los cuales vienen los *Fraxinus* (Hill y Sinclair, 2000) para evaluar su capacidad de transmisión en estos ecosistemas.

En Bogotá, los grupos 16Srl y 16SrVII son transmitidos por las morfoespecies MF04 y MF06, ambos de la subfamilia Deltocephalinae, pero desafortunadamente a la fecha no se cuenta con una identificación taxonómica precisa. Este desconocimiento de la entomofauna de cicadélidos, en la Sabana de Bogotá, sumado a la carencia de suficientes reportes de la biología de estos insectos en las condiciones locales, genera una necesidad inmediata de conocer la información sobre el ciclo de vida, los hospederos o la cantidad de generaciones por año, las fluctuaciones poblacionales de estas dos morfoespecies de Bogotá capaces de transmitir fitoplasmas. Este conocimiento es importante para establecer las relaciones ecológicas entre hospedero vegetal, patógeno y vector. Así como ayudará a generar estrategias de mitigación y manejo de la enfermedad, pues el control efectivo requiere la intervención en el ciclo de los vectores (Davis y Sinclair, 1998).

Por otra parte, es probable que cambios en las preferencias de alimentación de los insectos vectores jueguen un papel importante en la colonización de nuevos nichos ecológicos, dando la oportunidad a los fitoplasmas de diversificación (Davis y Sinclair, 1998), probablemente facilitada por la regulación de la expresión de genes PMU, o rearrreglos de estas regiones genómicas que hipotéticamente permitirían la adaptación a hospederos y vectores (Bai *et al.*, 2006).

En cualquier caso se requiere una identificación precisa del patógeno, y de los subgrupos que están representados en las poblaciones de insectos vectores en Bogotá. La presencia del subgrupo 16Srl-B se confirmó en *P. undulatum*, pero en las demás especies de árboles y en la morfoespecie MF04 (muestras a partir de secuencias completas de la región R16F2n/R16R2), los RFLP *in silico* sugieren la existencia de nuevas variantes para el grupo 16Srl. Esto indica que existe diversidad genética en las poblaciones de fitoplasmas de árboles e insectos de Bogotá del grupo 16Srl y también sugiere que los diferentes subgrupos de fitoplasmas podrían tener múltiples orígenes. Esta observación también se confirma a través del análisis de las distancias genéticas y de los dendogramas de secuencias de plantas e insectos (figuras 6-12, 6-13 y E-1), pues se observaron diferencias con las secuencias reportadas del grupo 16Srl, así como entre ellas mismas.

Lo anterior permite evidenciar que la información del gen 16S rRNA, aunque útil para definir la presencia de un grupo de fitoplasmas, no siempre genera la distinción molecular necesaria para la caracterización de subgrupos particulares de fitoplasmas (Duduk y Bertaccini, 2011). Por lo tanto se requiere una diferenciación más fina al interior de los

grupos de fitoplasmas, que además es útil para realizar estudios epidemiológicos dirigidos al control de la enfermedad y para intentar entender las relaciones entre el patógeno, su hospedero y vector. Para delimitar los subgrupos 16Srl se requiere analizar los patrones de digestión con las enzimas *TaqI*, *HhaI* y *TruI* (Mitrovic *et al.*, 2011), las cuales no se encontraban disponibles en el laboratorio al realizar este trabajo. Alternativamente se pueden usar genes no ribosomales como como *tuf* (EF-*tuf*), *rpsV*(*rpl22*), *rpsC*(*rps3*) (Martini *et al.*, 2007), *secY* (Lee *et al.*, 2006), *secA* (Hodgetts *et al.*, 2008) o *groEL* (Mitrovic *et al.*, 2011). En este trabajo se hicieron ensayos preliminares de amplificación por PCR de *secA*, pero no se obtuvo ningún amplicón con las muestras, a pesar de que si hubo amplificación con iniciadores para 16S rRNA (6- 24). La ausencia de amplicones de *secA* puede suceder si los iniciadores utilizados tienen baja complementariedad con las secuencias correspondientes de las cepas de fitoplasmas evaluadas, lo que haría la reacción de PCR muy ineficiente (Berges *et al.*, 1997).

De forma similar, los intentos sin resultado del uso de los iniciadores ES-1/Nad-2 y Rnc-1/PssA-1 para amplificar las regiones que contienen genes como *Amp*, *Imp* y *groEL* según lo reportado (Morton *et al.*, 2003; Kakizawa *et al.*, 2006; Kakizawa *et al.*, 2009; Mitrovic *et al.*, 2011). Sugieren la existencia de variabilidad incluso entre lo reportado, con las cepas de fitoplasmas mantenidas en cultivo en *C. roseus* (tabla 5-5) puesto que en los ensayos realizados con los iniciadores Rnc-1/PssA-1 se obtuvo un amplicón de aproximadamente 500 pb, cuando el esperado de 5Kb.

En las cepas de fitoplasmas de Bogotá, que muestran cierto grado de variabilidad y diversidad genética en el gen conservado ribosomal 16S rRNA, puede que los métodos reportados para fitoplasmas de otras regiones del mundo no sean eficientes. Es conocido que los genomas de fitoplasmas tienen 'plasticidad', pues aparentemente sufren re-arreglos de regiones putativas móviles (PMU) que podrían actuar como transposones replicativos compuestos (Bai *et al.*, 2006) y podrían permitir la adaptación de fitoplasmas a dos ambientes intracelulares disímiles (floema y órganos internos de vectores) (Bai *et al.*, 2009; Hogenhout y Loria, 2008; Hogenhout *et al.*, 2008; Sugio y Hogenhout, 2012). Por ello se requiere explorar y adaptar estas técnicas para generar información de secuencias de diferentes regiones del genoma en los fitoplasmas encontrados en Bogotá.

8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

8.1 Conclusiones

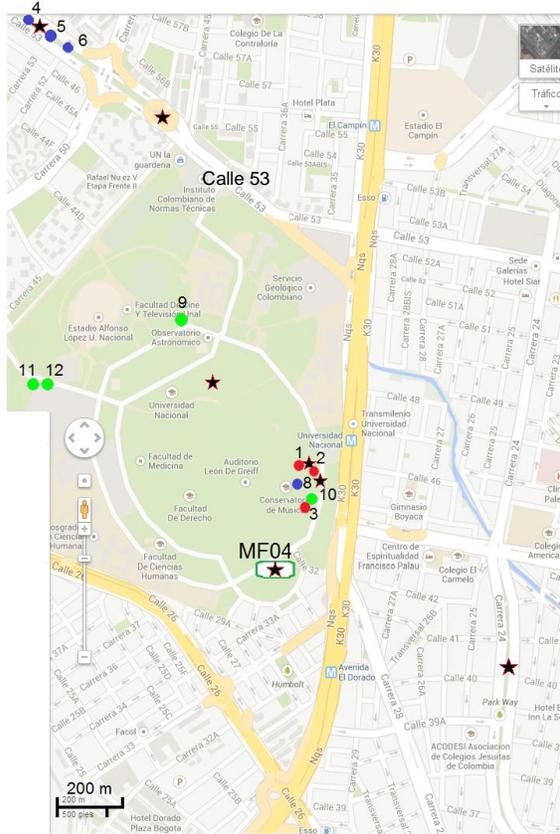
- Las nueve morfoespecies de cicadélidos encontradas en Bogotá, son portadoras de fitoplasmas, lo que indica que todas ellas se alimentan de plantas infectadas con fitoplasmas.
- En las morfoespecies de Cicadellidae MF01, MF02, MF03, MF04, MF05 y MF06 se detectaron fitoplasmas de los grupos 16Srl y/o 16SrVII, por su parte en las morfoespecies MF07, MF08 y MF09 sólo se encontró el grupo 16SrVII. Se evidenciaron infecciones mixtas (16Srl y 16SrVII) en un mismo individuo de MF01, MF02, MF03 y MF06.
- Insectos de las morfoespecies MF04 y MF06 son vectores de fitoplasmas de los grupos 16Srl y 16SrVII. Los cicadélidos MF04 transmiten con mayor eficiencia los fitoplasmas del grupo 16Srl, mientras que los de MF06 transmiten con similar eficiencia tanto fitoplasmas del grupo 16Srl como del grupo 16SrVII.
- Fitoplasmas del grupo 16Srl infectan *Fraxinus uhdei*, *Populus nigra*, *Pittosporum undulatum* y *Croton* spp. Fitoplasmas del grupo 16SrVII se reportan además en *P. nigra* y *Croton* spp., lo cual constituye evidencia de la coexistencia de ambos grupos de fitoplasmas en un mismo árbol.
- Se encontraron infecciones mixtas de fitoplasmas de los grupos 16Srl y 16SrVII en árboles e insectos cicadélidos, pero las relaciones ecológicas y epidemiológicas de estos fitoplasmas se desconocen.
- Con las condiciones de PCR evaluadas no se obtuvieron amplicones del tamaño esperado para genes con importancia potencial en la interacción hospedero-patógeno de fitoplasmas como *Imp*, *Amp* o para la delimitación fina de subgrupos de fitoplasmas como *SecA*.

8.2 Recomendaciones

- Estudiar las poblaciones y distribución de las morfoespecies de cicadélidos en la ciudad. También se recomienda obtener mayor número de individuos de MF01, MF02, MF03 y MF07.
- Determinar la capacidad de transmisión de fitoplasmas de las morfoespecies MF01, MF02, MF03, MF05 y MF07, realizando ensayos de transmisión a frijol u otros hospederos alternativos.
- Obtener secuencias de genes no ribosomales como *tuf*, *rp*, *secY* entre otros, que permitan realizar análisis multilocus de las poblaciones de fitoplasmas tanto en los hospederos vegetales como en insectos vectores para delimitar los subgrupos de fitoplasmas en Bogotá.
- Evaluar por métodos moleculares la posible presencia de grupos de fitoplasmas diferentes a 16SrI y 16SrVII, mediante el uso de iniciadores de PCR con diferente especificidad.
- En el género *Croton*, realizar observaciones y muestreos sistemáticos considerando las diferentes especies del género en áreas de ocurrencia de síntomas y caracterizar las poblaciones de cicadélidos MF09 que se encuentran en estos árboles.
- Establecer proyectos conjuntos con las autoridades competentes en el tema fitosanitario urbano, para generar un sistema de monitoreo de presencia de cicadélidos confirmados vectores en áreas que sirvan como corredor desde Bogotá con potencial de expansión hacia cultivos de interés comercial. Así mismo, establecer programas para evaluar el origen y sanidad del material vegetal que se usa en los programas de arborización urbana en la capital, y posiblemente municipios aledaños. Se recomienda además, incluir el análisis de fitoplasmas para evitar la propagación vegetativa desde árboles infectados e implementar restricciones de transporte de árboles urbanos entre regiones de Colombia.

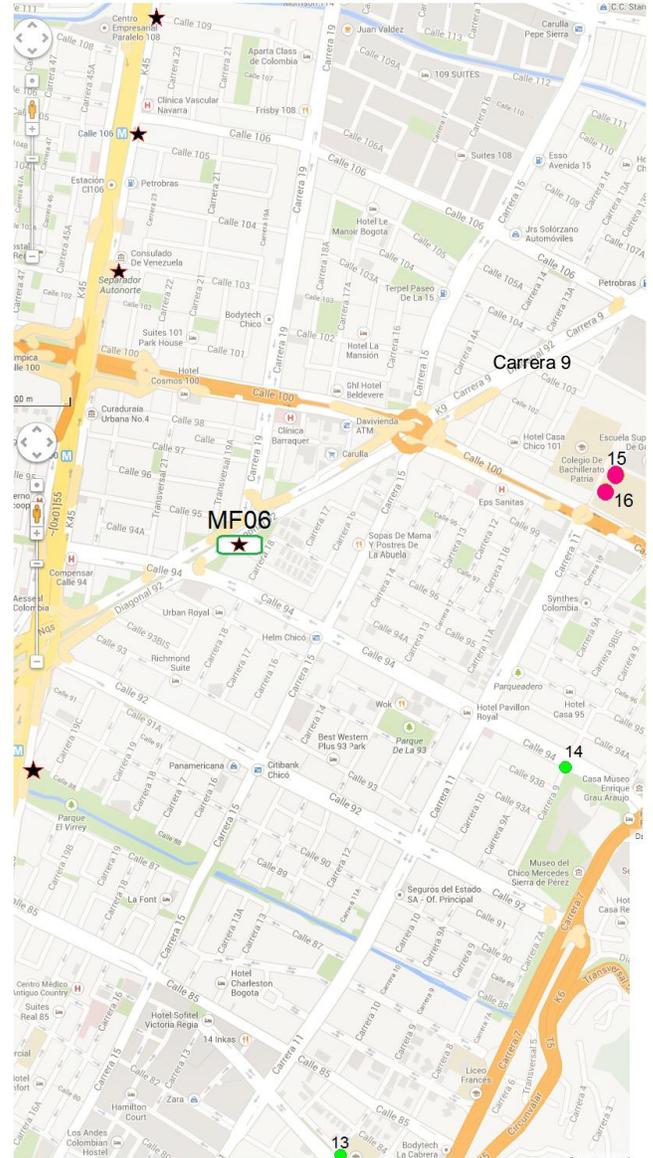
A. ANEXO: Mapas de localización de zonas de muestreo

ZONA 1. Teusaquillo



- *Croton spp.*
- *Pittosporum undulatum*
- *Populus nigra*
- *Fraxinus uhdei*
- ★ Muestreo de cicadélidos
- ★ Cicadélidos para ensayo de transmisión

ZONA 2. Chicó



Mapas tomados de Google Maps. La numeración de los árboles corresponde a la tabla C-2. Barra 200 m.

B. ANEXO: Secuencias de referencia de fitoplasmas

Tabla B-1. Secuencias de diferentes grupos 16S rRNA, utilizadas en alineamientos múltiples para comparación con las secuencias encontradas en Bogotá

GRUPO 16Sr	Fitoplasma asociado	Accesión GenBank
16Srl-A	Aster yellows witches'-broom	(NC 007716.1)
16Srl-B	'Ca. Phytoplasma asteris'	(NC 005303.2)
16Srl-C	Clover phyllody	(AF222065)
16Srl-D	Aster yellows strain PaWB	(AY265206)
16Srl-E	Blueberry stunt	(AY265213)
16Srl-F	Aster yellows strain ACLR-AY	(AY265211)
16SrII-A	Peanut witches'-broom	(L33765)
16SrII-B	'Ca. Phytoplasma aurantifolia'	(U15442)
16SrII-C	Cactus witches'-broom	(AJ293216)
16SrII-D	'Ca. Phytoplasma australasiae'	(Y10097)
16SrIII-A	Western X disease	(L04682)
16SrIII-B	Clover yellow edge	(AF189288)
16SrIV-A	Coconut lethal yellowing	(AF498307)
16SrIV-B	LfY5(PE65)-Oaxaca	(AF500334)
16SrIV-C	Carludovica palmata leaf yellowing	(AF237615)
16SrIX-A	Pigeon pea witches'-broom	(AF248957)
16SrIX-D	'Ca. Phytoplasma phoenicium'	(AF515636)
16SrV-A	'Ca. Phytoplasma ulmi'	(AY197655)
16SrV-B	'Ca. Phytoplasma ziziphi' strain JWB-G1	(AB052876)
16SrV-C	Alder yellows strain ALY882	(AY197642)
16SrV-G	'Ca. Phytoplasma ziziphi' strain JWB-Kor1	(AB052879)
16SrVI-A	'Ca. Phytoplasma trifolii'	(AY390261)
16SrVIII	Loofah witches'-broom	(AF353090)
16SrVII	Ash yellows strain AYCol4	(EF150364)
16SrVII-A	'Ca. Phytoplasma fraxini'	(AF092209)
16SrX-A	'Ca. Phytoplasma mali'	(AJ542541)
16SrX-C	'Ca. Phytoplasma pyri'	(AJ542543)
16SrX-D	'Ca. Phytoplasma spartii'	(X92869)
16SrX-F	'Ca. Phytoplasma prunorum'	(AJ542544)
16SrXI-A	'Ca. Phytoplasma oryzae'	(AB052873)
16SrXII-A	'Ca. Phytoplasma solani'	(AJ964960)
16SrXII-B	'Ca. Phytoplasma australiense'	(L76865)
16SrXII-C	Strawberry lethal yellows	(AJ243045)
16SrXII-D	'Ca. Phytoplasma japonicum'	(AB010425)
16SrXII-E	'Ca. Phytoplasma fragariae'	(DQ086423)
16SrXIII-A	Mexican periwinkle virescence	(AF248960)
16SrXIV-A	'Ca. Phytoplasma cynodontis'	(AJ550984)
16SrXIX-A	'Ca. Phytoplasma castanae'	(AB054986)

(Tabla B-1. Continuación)

GRUPO 16Sr	Fitoplasma asociado	Accesión GenBank
16SrXV-A	'Ca. Phytoplasma brasiliense'	(AF147708)
16SrXVI-A	'Ca. Phytoplasma graminis'	(AY725228)
16SrXVII-A	'Ca. Phytoplasma caricae'	(AY725234)
16SrXVIII-A	'Ca. Phytoplasma americanum'	(DQ174122)
16SrXX-A	'Ca. Phytoplasma rhamni'	(X76431)
16SrXXI-A	'Ca. Phytoplasma pini'	(AJ632155)
16SrXXII-A	Nigerian coconut lethal decline	(Y14175)
16SrXXIII-A	Buckland valley grapevine yellows	AY083605)
16SrXXIV-A	Sorghum bunchy shoot	(AF509322)
16SrXXV-A	Weeping tea witches'-broom	(AF521672)
16SrXXVI-A	Mauritius sugarcane yellows D3T1	(AJ539179)
16SrXXVII-A	Mauritius sugarcane yellows D3T2	(AJ539180)
16SrXXVIII-A	Havana Derbid	(AY744945)
16SrI	Maize bushy stunt phytoplasma MBSColombia	(HQ530152.1)
16SrIII	Lethal wilt oil palm phytoplasma	(AY739023)
16SrIII	Solanum quitoense machorreo phytoplasma	(AY731819)
16SrIII	Cassava frogskin disease phytoplasma strain FSDY17	(AY737646)
16SrVII	Liquidambar phytoplasma	(GU810150.1)
16SrVII	Candidatus phytoplasma fraxini strain AYColM3	(EF150368.1)
16SrVII	Candidatus phytoplasma fraxini strain AYCol12	(EF150365)
Grupos Externo	Acholeplasma palmae	(L33734)
	Acholeplasma laidlawii	(M23932)

C. ANEXO: Nomenclatura muestras de ADN

Tabla C-1. Lista de muestras de ADN total de cicadélidos muestreados en Bogotá. La “i” antecediendo el número significa que es ADN total de insectos.

ADN total	Morfoespecie	ADN Total	Morfoespecie
i20	MF01	i36	MF06
i01	MF02	i53	
i05	MF03	i54	
i06	MF04	i56	
i12		i67	
i13		i68	
i15		i77	
i16		i78	
i19		i79	
i21		i80	
i22		i81	
i23		i82	
i24		i40	
i38	i27	MF08	
i39	i31		
i49	i44		
i52	i28	MF09	
i57	i32		
i58	i33		
i59	i41		
i02	MF06		i42
i03		i60	
i04	MF05	i11	MF05
i07		i14	
i08		i17	
i09		i18	
i10		i37	
Pool1		i27, i31	MF08
Pool2		i28, i32, i33,	MF09
Pool3	i06, i12, i13, i15, i16, i19, i21, i22, i23, i24, i38, i39		MF04
Pool4	i04, i07, i08, i09, i10, i11, i14, i17, i18, i37		MF05
Pool5		i02, i03, i05	MF06

Morfoespecie no asignada (MF Na): i43, i53, i54, i55, i56, i57, i58, i59

Tabla C-2. Lista de muestras de ADN total de árboles.

Especie	ARBOL	LUGAR	Ubicación en mapa	Muestras ADN total de plantas
<i>P. nigra</i>	PN arbol1	UNAL- ARTES	1	ADN 37
	PN arbol1	UNAL- ARTES	1	ADN 44
	PN arbol3	UNAL-ARTES	2	ADN 45
	PN arbol4	UNAL-MUSICA	3	ADN 46
<i>P. undulatum</i>	PU arbol1	CII 53 Cra 54	4	ADN 30
	PU arbol2	CII53	5	ADN 31
	PU arbol3	CII 53	6	ADN 36
	PU arbol4	Cajicá	7	ADN 42
	PU arbol5	UNAL- artes	8	ADN 43
<i>Croton spp.</i>	CB arbol1	UNAL- ENTRADA 53	9	ADN 32
	CB arbol2	UNAL- VIA MUSICA	10	ADN 33
	CB arbol3	UNAL- ENTRADA 50	11	ADN 34
	CB arbol4	UNAL- ENTRADA 50	12	ADN 35
	CB arbol5	Calle 83 Cra 9	13	ADN 52
	CB arbol6	Cra 9 CII 94	14	ADN 54
<i>F. uhdei</i>	Urapán 1	UMNG Calle 100	15	ADN 28, ADN 29
	Urapán 2	UMNG Calle 100	16	ADN 24, ADN 25, ADN 26

La localización de los árboles muestreados se observa en los mapas del Anexo A.

Tabla C-3. Lista de muestras de ADN total de insectos y frijol de ensayos de transmisión.

Nomenclatura de muestras Ensayo		ADN total de insectos que se alimentaron de cada planta	ADN total de frijoles	
			Parte aérea	Raíces
Morfoespecie MF04	Frijol 1	i45, i69, i70, i50	TF23	-
	Frijol 2	i48	TF3	TF11
	Frijol 3	i46, i71, i72, i51	TF4	TF12
	Frijol 4	i47, i73, i74, i52	TF5	TF13
	Frijol 5	i49, i75, i76	TF6	TF14
Morfoespecie MF06	Frijol 6	i53, i67	TF19	TF7
	Frijol 7	i54, i68	TF20	TF8
	Frijol 8	i55, i65, i66	TF21	TF9
	Frijol 9	i56	TF22	TF10
Frijol 10 Testigo			TF16	TF15

El ADN total obtenido de insectos de la morfoespecie MF04 y MF06, la “i” antecediendo el número significa que es ADN total de insectos. El ADN obtenido de las plantas de frijol al finalizar el ensayo de transmisión tanto de la parte aérea o raíces se denominó con “TF” (Transmisión frijol) seguido de un número consecutivo.

D. ANEXO: Lista de secuencias

Tabla D-1. Secuencias de amplímeros obtenidos a partir de ADN total de árboles.

Espece	ADN total de árboles	Nomenclatura de secuencias obtenidas en este trabajo	Grupo 16Sr	Amplímero
<i>F. uhdei</i>	ADN24	C5	16Srl	M13F/M13R
		C6	16Srl	
		C7	16Srl	
		T3	16Srl	
		T5	16Srl	
		T4	16Srl	
	ADN28	B8	16Srl	
		162	16Srl	R16F2n/R16R2
	ADN24	P1	16Srl	fU5/rU3
P11		16Srl		
ADN28	P2	16Srl		
<i>P. nigra</i>	ADN 37	T2	16Srl	M13F/M13R
		T7	16Srl	
		T8	16Srl	
		C1	16Srl	
		C12	16Srl	
	LMP6	16SrVII	PhyRNAF3.3/ PhyRNAR2.6	
<i>P. undulatum</i>	ADN 36	C10	16Srl	M13F/M13R
		C11	16Srl	
	ADN 31	B09	16Srl	R16F2n/R16R2
		B9	16Srl	
<i>Croton</i> spp.	ADN 32	C21	16Srl	fU5/rU3
	ADN 33	C8	16Srl	M13F/M13R
		C9	16Srl	
		T1	16Srl	
		T6	16Srl	
	ADN 32	B10	16Srl	R16F2n/R16R2
	ADN 34	B12	16Srl	
	ADN 33	L28	16Srl	fU5/rU3
		L38	16Srl	PhyRNAF3.3/ PhyRNAR2.6
LMP5		16SrVII	PhyRNAF3.3/ PhyRNAR2.6	

Tabla D-2. Secuencias de amplímeros obtenidos de ADN total de morfoespecies de cicadélidos.

Morfoespecie	ADN total	Nombre Secuencia consenso	Grupo	Reacción
MF01	i20	L056.1	16Srl	fU5/rU3
		RM38	16SrVII	PhyRNA3.3/PhyRNA2.6
MF02	i1	L57.1	16Srl	fU5/rU3
MF03	i5	L58.1	16Srl	
		RM40	16SrVII	PhyRNA3.3/PhyRNA2.6
MF04	i12	L60.1	16Srl	fU5/rU3
		S7	16Srl	M13F/M13R
		L60.2	16Srl	fU5/rU3
		S10	16Srl	M13F/M13R
		S11	16Srl	
	S8	16Srl		
	i13	L61.1	16Srl	fU5/rU3
	i15	T9	16Srl	M13F/M13R
	i16	L62.2	16Srl	fU5/rU3
	i21	P3	16Srl	
	i23	P7	16Srl	
	i24	P8	16Srl	
	i38	L104 - RM50	16SrVII	R16F2n/R16R2
i39	RM48	16SrVII	PhyRNA3.3/PhyRNA2.6	
Pool3	RM41	16SrVII		
MF05	i11	L66.1	16Srl	fU5/rU3
	i37	L103	16Srl	R16F2n/R16R2
	i4	L65.2	16Srl	fU5/rU3
	i9	P5	16Srl	
	Pool4	RM42	16SrVII	PhyRNA3.3/PhyRNA2.6
MF06	i2	L59.1	16Srl	fU5/rU3
	i35	L098 -L90-M1	16Srl	R16F2n/R16R2
	Pool5	L097 -RM43	16SrVII	
MF07	i40	L99	16SrVII	
		RM45	16SrVII	PhyRNA3.3/PhyRNA2.6
MF08	Pool1	L100	16SrVII	R16F2n/R16R2
		RM46	16SrVII	PhyRNA3.3/PhyRNA2.6
MF09	Pool2	L101	16SrVII	R16F2n/R16R2
		RM47	16SrVII	PhyRNA3.3/PhyRNA2.6

Tabla D-3. Secuencias de amplímeros obtenidos de ADN total de frijol post-inoculación con cicadélidos.

Ensayo Transmisión	ADN total	Secuencia	Grupo	Amplímeros
Frijol 2	TF03	RI26	16Srl	R16mF2/R16mR1
	TF11	RI31	16Srl	
	TF11	RI53	16SrVII	PhyRNAF3.3/PhyRNAR2.6
Frijol 4	TF05	RI28	16Srl	R16mF2/R16mR1
Frijol 5	TF06	RI29	16Srl	
	TF14	RI35	16Srl	
	TF14	RI56	16SrVII	PhyRNAF3.3/PhyRNAR2.6
Frijol 6	TF07	RI30	16Srl	R16mF2/R16mR1
	TF19	RI34	16Srl	
Frijol 3	TF12	RI32	16Srl	
Frijol 8	TF09	RI39	16Srl	
Frijol 9	TF22	RI40	16Srl	

Tabla E-1. Matriz de distancias estimadas entre secuencias de árboles e insectos en Bogotá. Análisis calculado con el modelo 'Maximum Composite Likelihood' para 469 posiciones de la región PhyRNAF3.37PhyRNA2.6

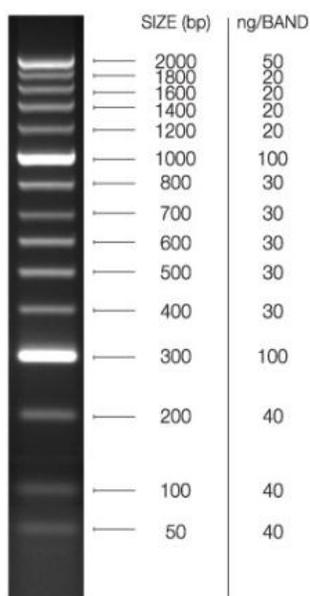
1	16SrI-A (NC 007716.1)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
2	16SrI-B (NC 005303.2)	0.00																				
3	16SrI-C (AF222065)	0.01	0.00																			
4	16SrI-D (AY265206)	0.00	0.00	0.00																		
5	16SrI-E (AY265213)	0.00	0.00	0.00	0.00																	
6	16SrI-F (AY265211)	0.01	0.00	0.01	0.00	0.00																
7	16SrVII (EF150364)	0.10	0.10	0.09	0.10	0.10	0.10															
8	16SrVII-A(AF092209)	0.10	0.10	0.09	0.10	0.10	0.10	0.00														
9	<i>Croton</i> spp. (B12)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.10	0.10													
10	<i>Croton</i> spp.(JQ730858)	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.11	0.11	0.01												
11	<i>Croton</i> spp.(C21)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.10	0.10	0.00	0.01											
12	<i>Croton</i> spp.(LMP5)	0.10	0.09	0.09	0.09	0.09	0.10	0.00	0.00	0.09	0.10	0.09										
13	<i>Croton</i> spp.(L28)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.10	0.10	0.00	0.01	0.00	0.09									
14	16SrVII (EF150365)	0.10	0.09	0.09	0.09	0.09	0.10	0.00	0.00	0.09	0.10	0.09	0.00	0.09								
15	16SrVII (EF150368.1)	0.10	0.10	0.09	0.10	0.10	0.10	0.01	0.01	0.10	0.10	0.10	0.00	0.10	0.00							
16	<i>F. uhdei</i> (P1-T4)	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.01	0.10	0.10	0.00	0.01	0.00	0.10	0.00	0.10	0.10						
17	<i>F. uhdei</i> (B8R)	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01	0.02	0.11	0.11	0.01	0.02	0.01	0.11	0.01	0.11	0.11	0.01					
18	<i>F. uhdei</i> (P2)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.10	0.10	0.00	0.01	0.00	0.09	0.00	0.09	0.10	0.00	0.01				
19	<i>F. uhdei</i> (JQ730859)	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.01	0.10	0.10	0.00	0.01	0.00	0.10	0.00	0.10	0.10	0.00	0.01	0.00			
20	16SrVII (L1GU810150.1)	0.10	0.09	0.09	0.09	0.09	0.10	0.00	0.00	0.09	0.10	0.09	0.00	0.09	0.00	0.00	0.10	0.11	0.09	0.10		
21	16SrI (HQ530152.1)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.10	0.10	0.00	0.01	0.00	0.09	0.00	0.09	0.10	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.09
22	MF01 (L56.1)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.10	0.10	0.00	0.01	0.00	0.09	0.00	0.09	0.10	0.00	0.01	0.00	0.00	0.09	0.00
23	MF01 (RM38)	0.10	0.09	0.09	0.09	0.09	0.10	0.00	0.00	0.09	0.10	0.09	0.00	0.09	0.00	0.00	0.10	0.11	0.09	0.10	0.00	0.09
24	MF02 (L57.1)	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.01	0.10	0.10	0.00	0.01	0.00	0.10	0.00	0.10	0.10	0.00	0.01	0.00	0.00	0.10	0.00
25	MF03 (L58.1)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.10	0.10	0.00	0.01	0.00	0.09	0.00	0.09	0.10	0.00	0.01	0.00	0.00	0.09	0.00
26	MF03(RM40)	0.10	0.09	0.09	0.09	0.09	0.10	0.01	0.01	0.09	0.10	0.09	0.01	0.09	0.01	0.01	0.10	0.11	0.09	0.10	0.01	0.09
27	MF04 (L61.1)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.10	0.10	0.00	0.01	0.00	0.09	0.00	0.09	0.10	0.00	0.01	0.00	0.00	0.09	0.00
28	MF04 (S7)	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.11	0.11	0.02	0.02	0.02	0.10	0.02	0.10	0.11	0.02	0.03	0.02	0.02	0.10	0.02
29	MF04 (S8-S10-S11)	0.08	0.07	0.08	0.07	0.07	0.08	0.19	0.19	0.07	0.08	0.07	0.18	0.07	0.18	0.18	0.08	0.09	0.07	0.07	0.18	0.07
30	MF04 (T9)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.10	0.10	0.00	0.01	0.00	0.09	0.00	0.09	0.10	0.00	0.01	0.00	0.00	0.09	0.00
31	MF04 (P8)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.10	0.10	0.00	0.01	0.00	0.09	0.00	0.09	0.10	0.00	0.01	0.00	0.00	0.09	0.00
32	MF04(P3)	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.01	0.10	0.10	0.00	0.01	0.00	0.09	0.00	0.09	0.09	0.00	0.01	0.00	0.00	0.09	0.00
33	MF04 (L104-RM50)	0.10	0.10	0.09	0.10	0.10	0.10	0.01	0.01	0.10	0.10	0.10	0.00	0.10	0.00	0.00	0.10	0.11	0.10	0.10	0.00	0.10
34	MF04 (RM41)	0.10	0.09	0.09	0.09	0.09	0.10	0.00	0.00	0.09	0.10	0.09	0.00	0.09	0.00	0.00	0.10	0.11	0.09	0.10	0.00	0.09
35	MF05 (P5)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.10	0.10	0.00	0.01	0.00	0.09	0.00	0.09	0.10	0.00	0.01	0.00	0.00	0.09	0.00
36	MF05 (L66.1)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.10	0.10	0.00	0.01	0.00	0.09	0.00	0.09	0.10	0.00	0.01	0.00	0.00	0.09	0.00
37	MF05 (RM42)	0.10	0.09	0.09	0.09	0.09	0.10	0.00	0.00	0.09	0.10	0.09	0.00	0.09	0.00	0.00	0.10	0.11	0.09	0.10	0.00	0.09
38	MF06 (L59.1)	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.01	0.10	0.10	0.00	0.01	0.00	0.10	0.00	0.10	0.10	0.00	0.01	0.00	0.00	0.10	0.00
39	MF06 (M1-L90-L98)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.10	0.10	0.00	0.01	0.00	0.09	0.00	0.09	0.10	0.00	0.01	0.00	0.00	0.09	0.00
40	MF06 (RM48 -RM51)	0.10	0.10	0.09	0.10	0.10	0.10	0.01	0.01	0.10	0.11	0.10	0.00	0.10	0.00	0.01	0.10	0.11	0.10	0.10	0.00	0.10
41	MF06 (RM43-L97)	0.10	0.10	0.09	0.10	0.10	0.10	0.01	0.01	0.10	0.10	0.10	0.00	0.10	0.00	0.00	0.10	0.11	0.10	0.10	0.00	0.10
42	MF07 (RM45)	0.10	0.09	0.09	0.09	0.09	0.10	0.00	0.00	0.09	0.10	0.09	0.00	0.09	0.00	0.00	0.10	0.11	0.09	0.10	0.00	0.09
43	MF08 (RM46)	0.10	0.09	0.09	0.09	0.09	0.10	0.00	0.00	0.09	0.10	0.09	0.00	0.09	0.00	0.00	0.10	0.11	0.09	0.10	0.00	0.09
44	MF09 (RM47)	0.10	0.10	0.09	0.10	0.10	0.10	0.01	0.01	0.10	0.10	0.10	0.00	0.10	0.00	0.01	0.10	0.11	0.10	0.10	0.00	0.10
45	<i>P. undulatum</i> (JQ730861)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.10	0.10	0.00	0.01	0.00	0.09	0.00	0.09	0.10	0.00	0.01	0.00	0.00	0.09	0.00
46	<i>P. nigra</i> (LMP6)	0.10	0.09	0.09	0.09	0.09	0.10	0.00	0.00	0.09	0.10	0.09	0.00	0.09	0.00	0.00	0.10	0.11	0.09	0.10	0.00	0.09
47	<i>P. nigra</i> (JQ730860)	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.01	0.10	0.10	0.00	0.01	0.00	0.10	0.00	0.10	0.10	0.00	0.01	0.00	0.00	0.10	0.00

1	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46
23	0.09																								
24	0.00	0.10																							
25	0.00	0.09	0.00																						
26	0.09	0.01	0.10	0.09																					
27	0.00	0.09	0.00	0.00	0.09																				
28	0.02	0.10	0.02	0.02	0.10	0.02																			
29	0.07	0.18	0.08	0.07	0.18	0.07	0.09																		
30	0.00	0.09	0.00	0.00	0.09	0.00	0.02	0.07	0.00																
31	0.00	0.09	0.00	0.00	0.09	0.00	0.02	0.07	0.00	0.00															
32	0.00	0.09	0.00	0.00	0.09	0.00	0.02	0.08	0.00	0.00															
33	0.10	0.00	0.10	0.10	0.01	0.10	0.11	0.18	0.10	0.10	0.09														
34	0.09	0.00	0.10	0.09	0.01	0.09	0.10	0.18	0.09	0.09	0.09	0.00													
35	0.00	0.09	0.00	0.00	0.09	0.00	0.02	0.07	0.00	0.00	0.00	0.10	0.09												
36	0.00	0.09	0.00	0.00	0.09	0.00	0.02	0.07	0.00	0.00	0.00	0.10	0.09	0.00											
37	0.09	0.00	0.10	0.09	0.01	0.09	0.10	0.18	0.09	0.09	0.09	0.00	0.00	0.09	0.09										
38	0.00	0.10	0.00	0.00	0.10	0.00	0.02	0.08	0.00	0.00	0.00	0.10	0.10	0.00	0.00	0.10									
39	0.00	0.09	0.00	0.00	0.09	0.00	0.02	0.07	0.00	0.00	0.00	0.10	0.09	0.00	0.00	0.09	0.00								
40	0.10	0.00	0.10	0.10	0.01	0.10	0.11	0.19	0.10	0.10	0.10	0.01	0.00	0.10	0.10	0.00	0.10	0.10							
41	0.10	0.00	0.10	0.10	0.01	0.10	0.11	0.18	0.10	0.10	0.09	0.00	0.00	0.10	0.10	0.00	0.10	0.10	0.01						
42	0.09	0.00	0.10	0.09	0.01	0.09	0.10	0.18	0.09	0.09	0.09	0.00	0.00	0.09	0.09	0.00	0.10	0.09	0.00	0.00					
43	0.09	0.00	0.10	0.09	0.01	0.09	0.10	0.18	0.09	0.09	0.09	0.00	0.00	0.09	0.09	0.00	0.10	0.09	0.00	0.00	0.00				
44	0.10	0.00	0.10	0.10	0.01	0.10	0.11	0.18	0.10	0.10	0.09	0.01	0.00	0.10	0.10	0.00	0.10	0.10	0.01	0.01	0.00	0.00			
45	0.00	0.09	0.00	0.00	0.09	0.00	0.02	0.07	0.00	0.00	0.00	0.10	0.09	0.00	0.00	0.09	0.00	0.00	0.10	0.10	0.09	0.09	0.10		
46	0.09	0.00	0.10	0.09	0.01	0.09	0.10	0.18	0.09	0.09	0.09	0.00	0.00	0.09	0.09	0.00	0.10	0.09	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.09	
47	0.00	0.10	0.00	0.00	0.10	0.00	0.02	0.08	0.00	0.00	0.00	0.10	0.10	0.00	0.00	0.10	0.00	0.00	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.00	0.10

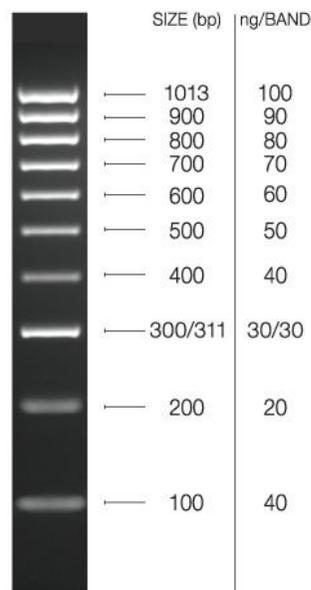
F. ANEXO. Patrones RFLP de amplicones (R16F2n/R16R2) obtenidos en cicadélidos en Bogotá

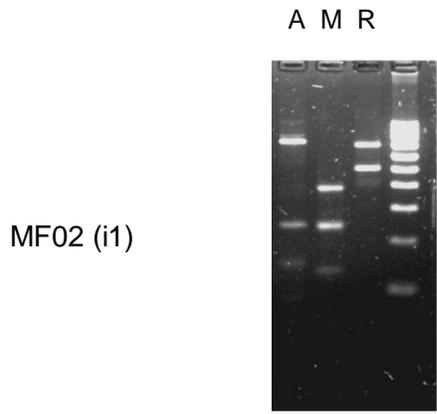
Electroforesis en gel de agarosa al 3% que muestran los productos de digestión con diferentes enzimas de restricción (A: *AluI*, M: *MseI*, R: *RsaI*, H: *HinfI*). En la parte izquierda de cada gel de electroforesis se indica la morfoespecie y en paréntesis, la muestra de ADN correspondiente.

Hyperladder 50pb

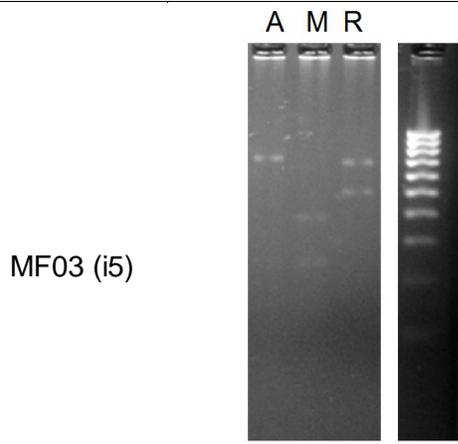


Hyperladder 100pb

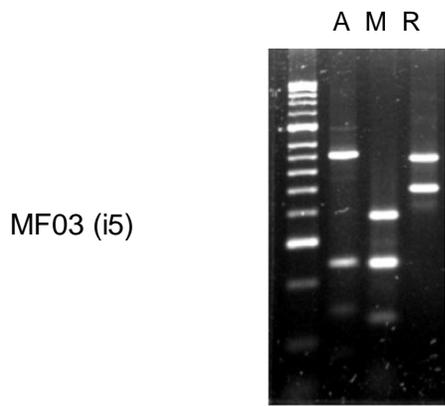




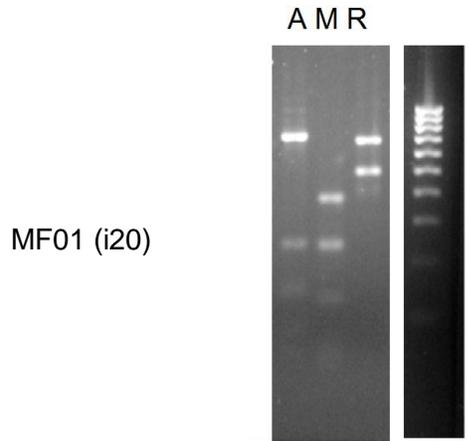
16SrVII



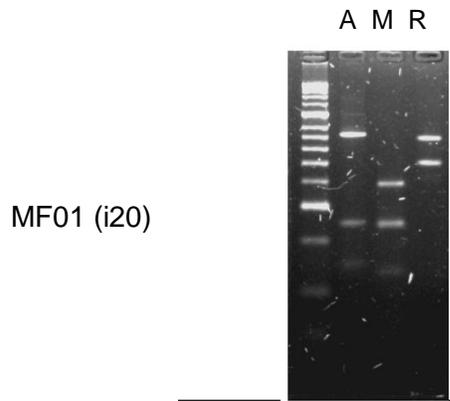
16SrVII



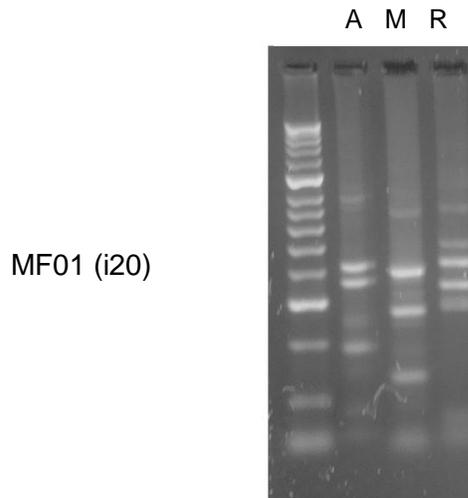
16SrVII



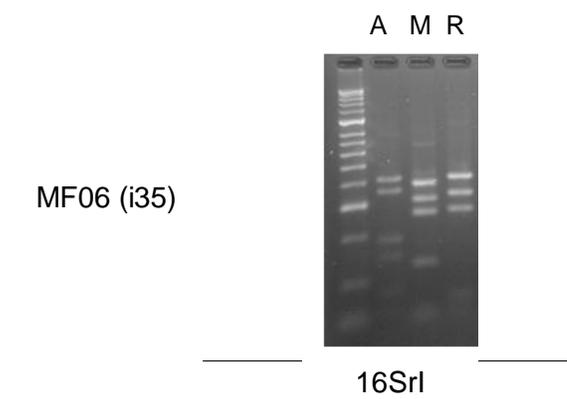
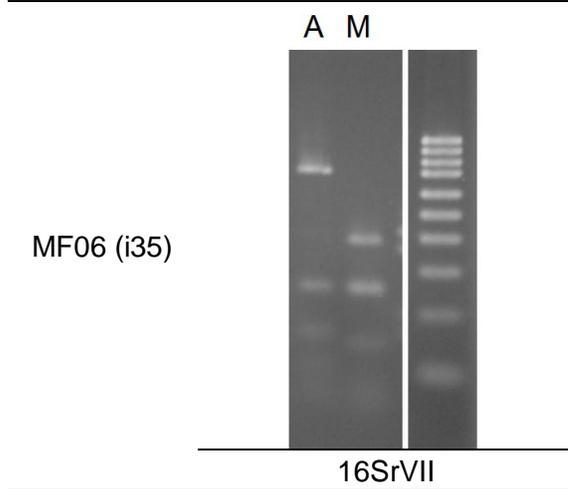
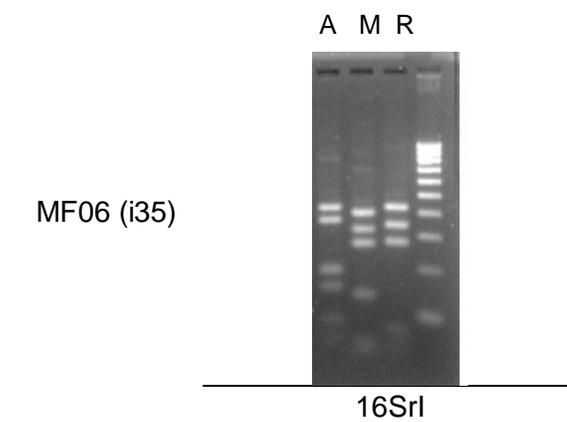
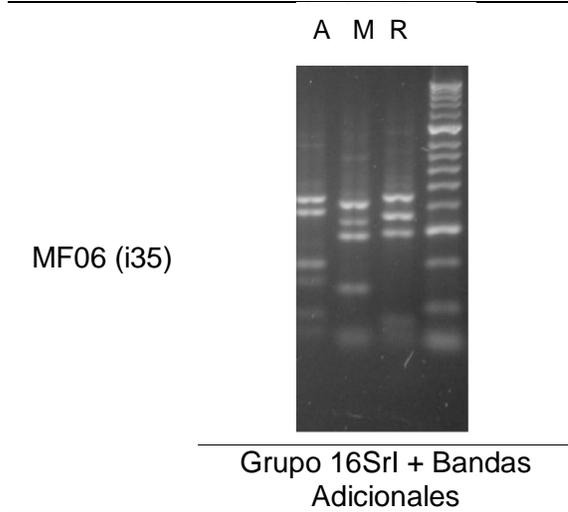
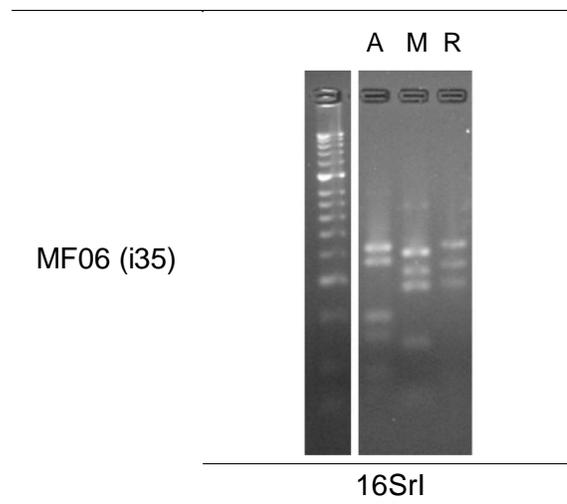
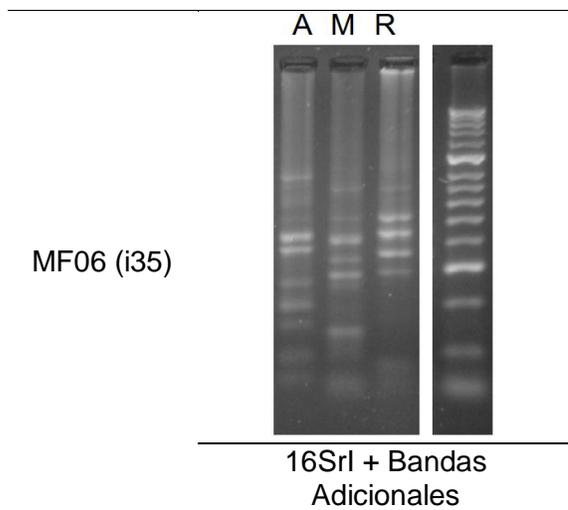
16SrVII

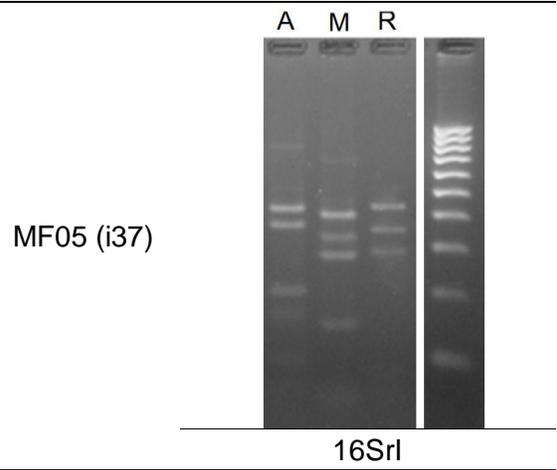
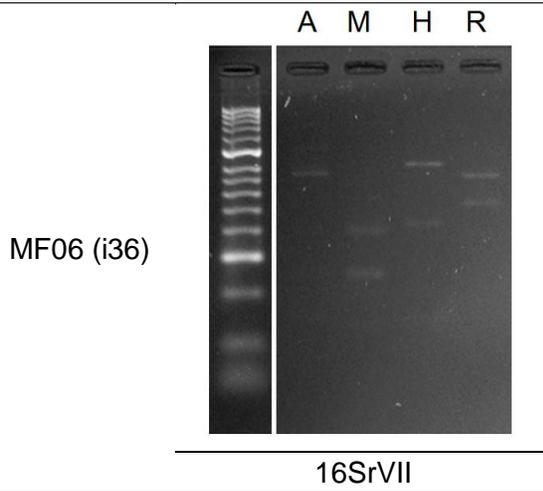
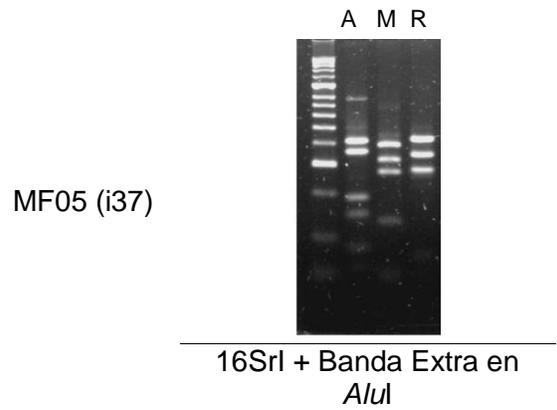
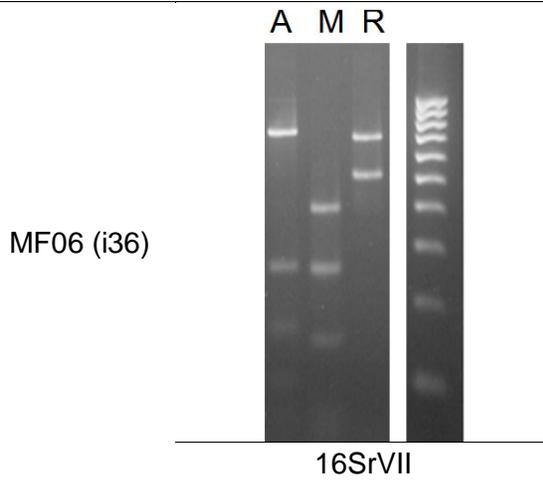
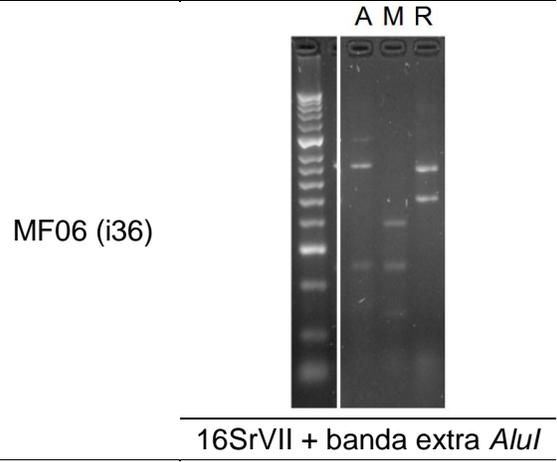
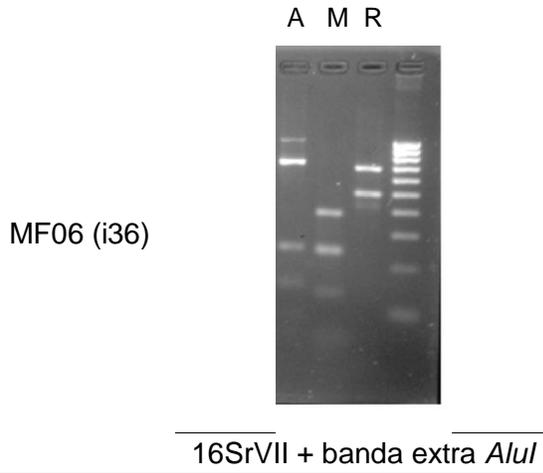


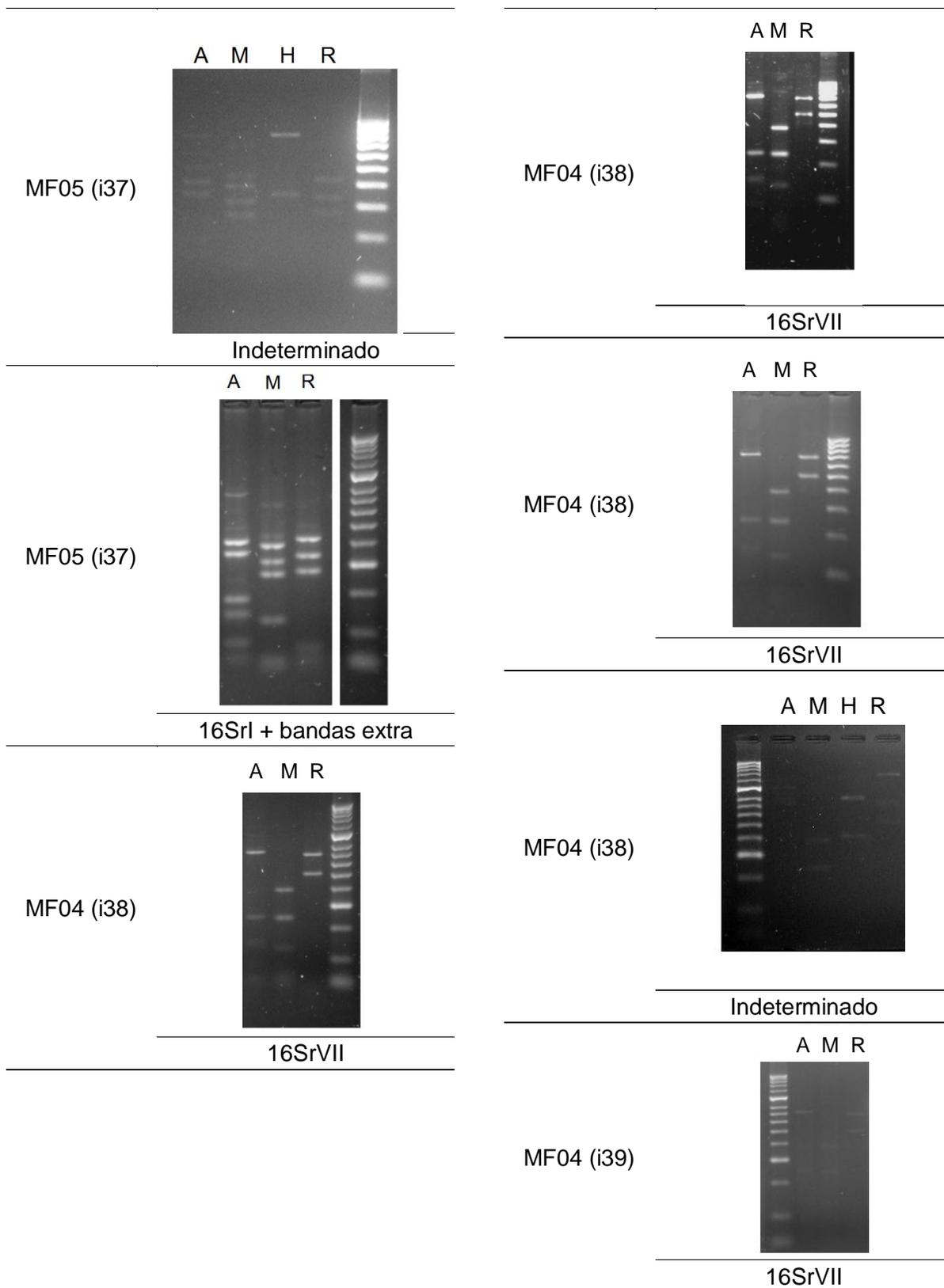
16SrVII



16SrI+ 16SrVII

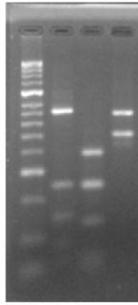






MF07 (i40)

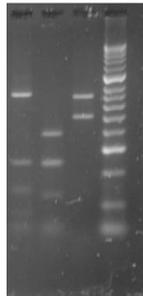
A37 M37 R37



16SrVII

MF07 (i40)

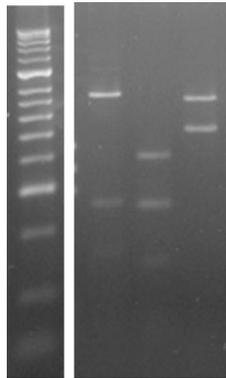
A5 M5 R5



16SrVII

MF07 (i40)

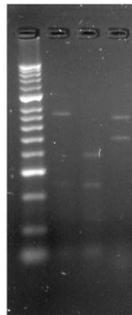
A M R



16SrVII

MF08 (i44)

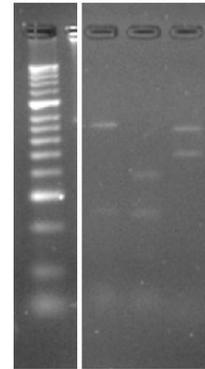
A11 M11 R11



16SrVII

MF08 (i44)

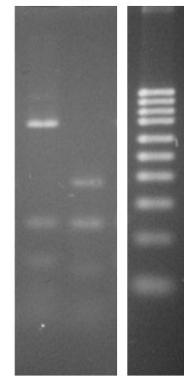
A M R



16SrVII

MF04 (i59)

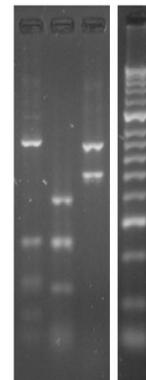
A M



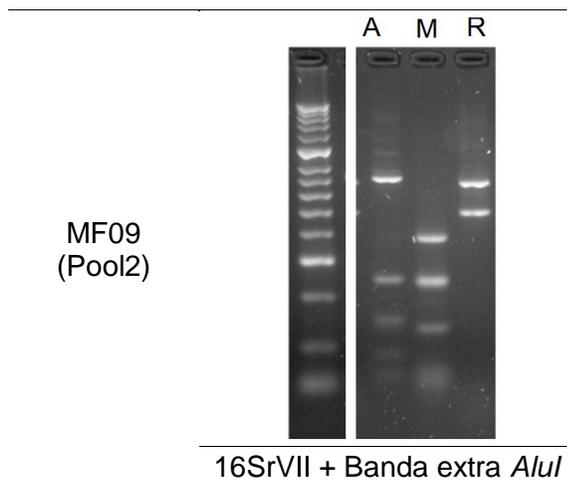
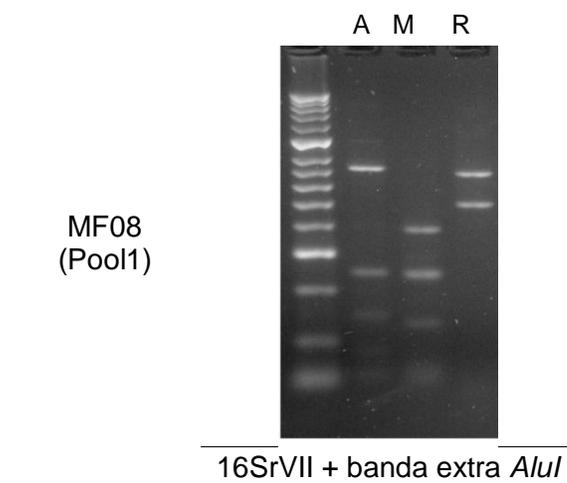
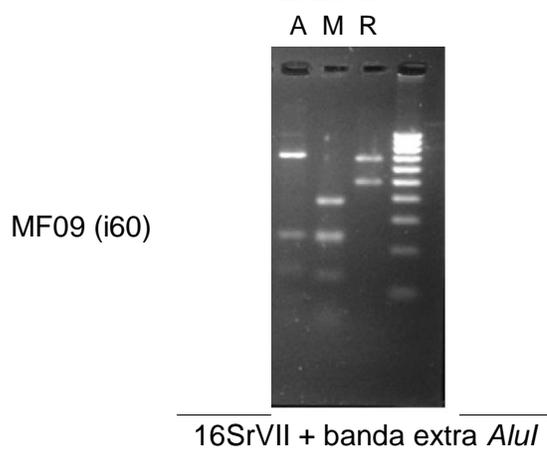
16SrVII

MF09 (i60)

A M R



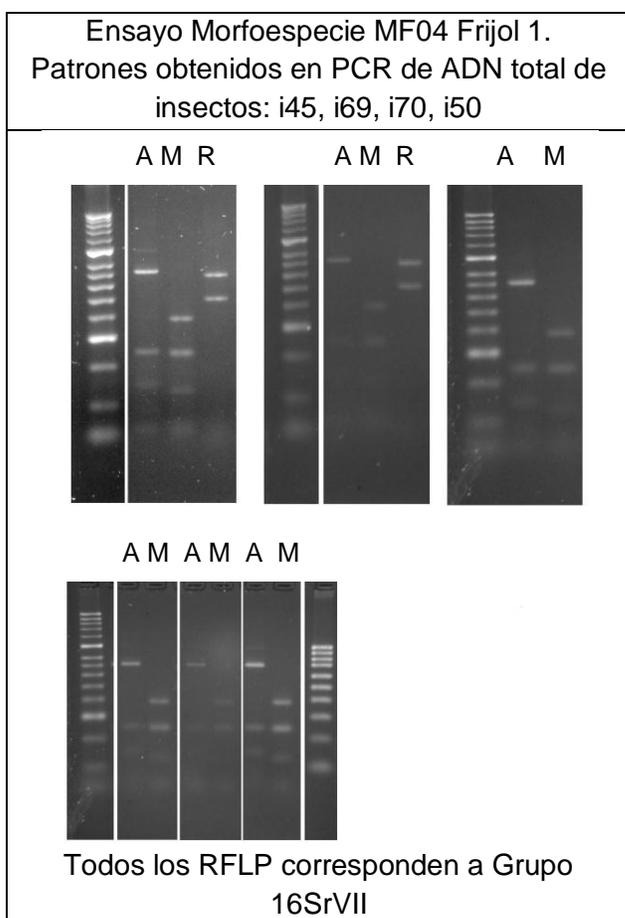
16SrVII

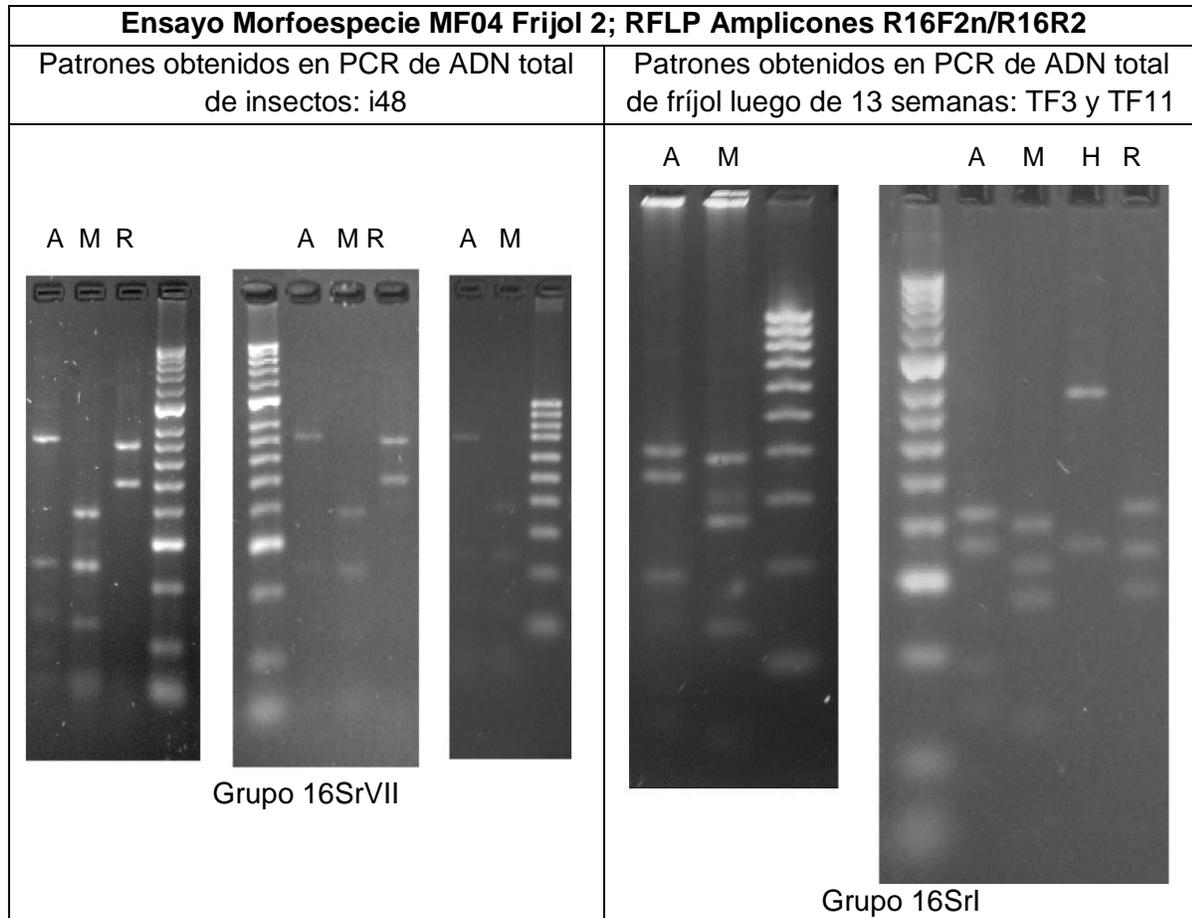


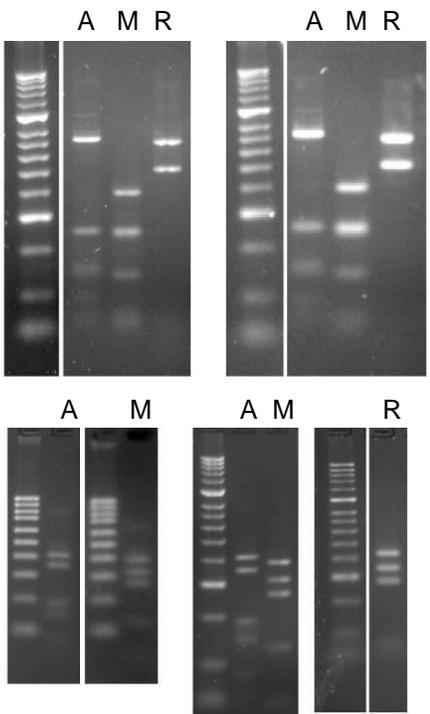
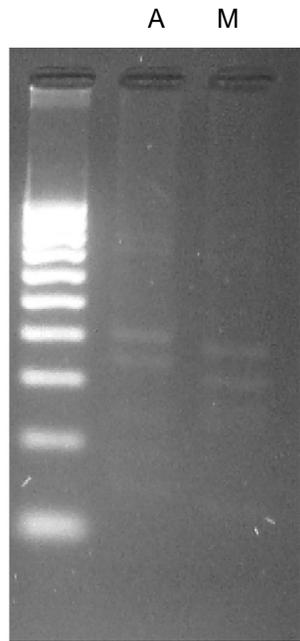
G. ANEXO: Patrones RFLP de ensayos de transmisión

En las tablas a continuación, los carriles que tienen la misma numeración, corresponden a la misma reacción de PCR donde se obtuvo el amplímero de la región R16F2n/R16R2. La letra que antecede cada número corresponde a la enzima con la cual se digirió el amplicón: *AluI* (A y a), *MseI* (M y m), *RsaI* (R y r), *HinfI* (H y h). El patrón de restricción obtenido para cada grupo de fitoplasmas se observa en la figura

Tabla F-1. Electroforesis en gel de agarosa al 3% mostrando RFLP de amplicones R16F2n/R16R2. En insectos usados para la transmisión y el plantas post-inoculación.



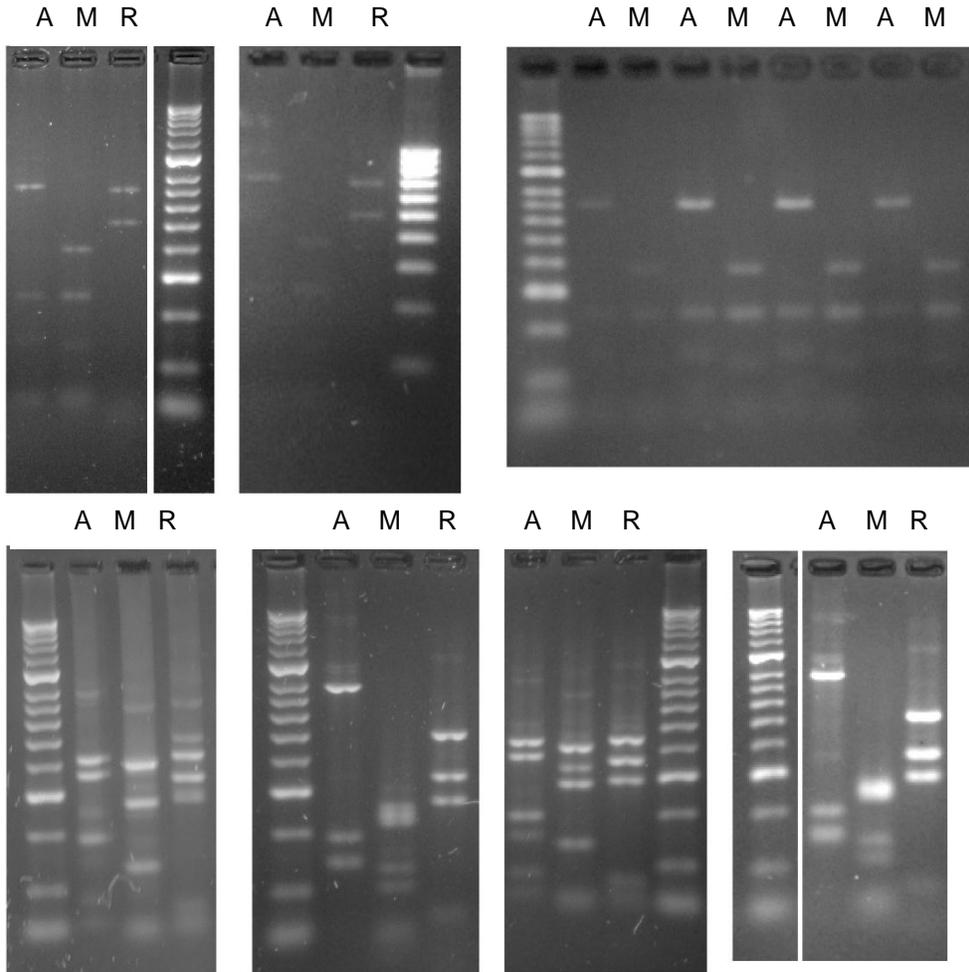


Ensayo Morfoespecie MF04 Frijol 3; RFLP Amplicones R16F2n/R16R2	
Patrones obtenidos en PCR de ADN total de insectos: i46, i71	Patrones obtenidos en PCR de ADN total de frijol luego de 13 semanas: TF4
 <p>figura superiores Grupo 16SrVII figuras inferiores: Grupo 16SrI</p>	 <p>Grupo 16SrI</p>

Ensayo Morfoespecie MF04 Frijol 4, RFLP Amplicones R16F2n/R16R2

Patrones obtenidos en PCR de ADN total de insectos: i47, i73, i74, i52

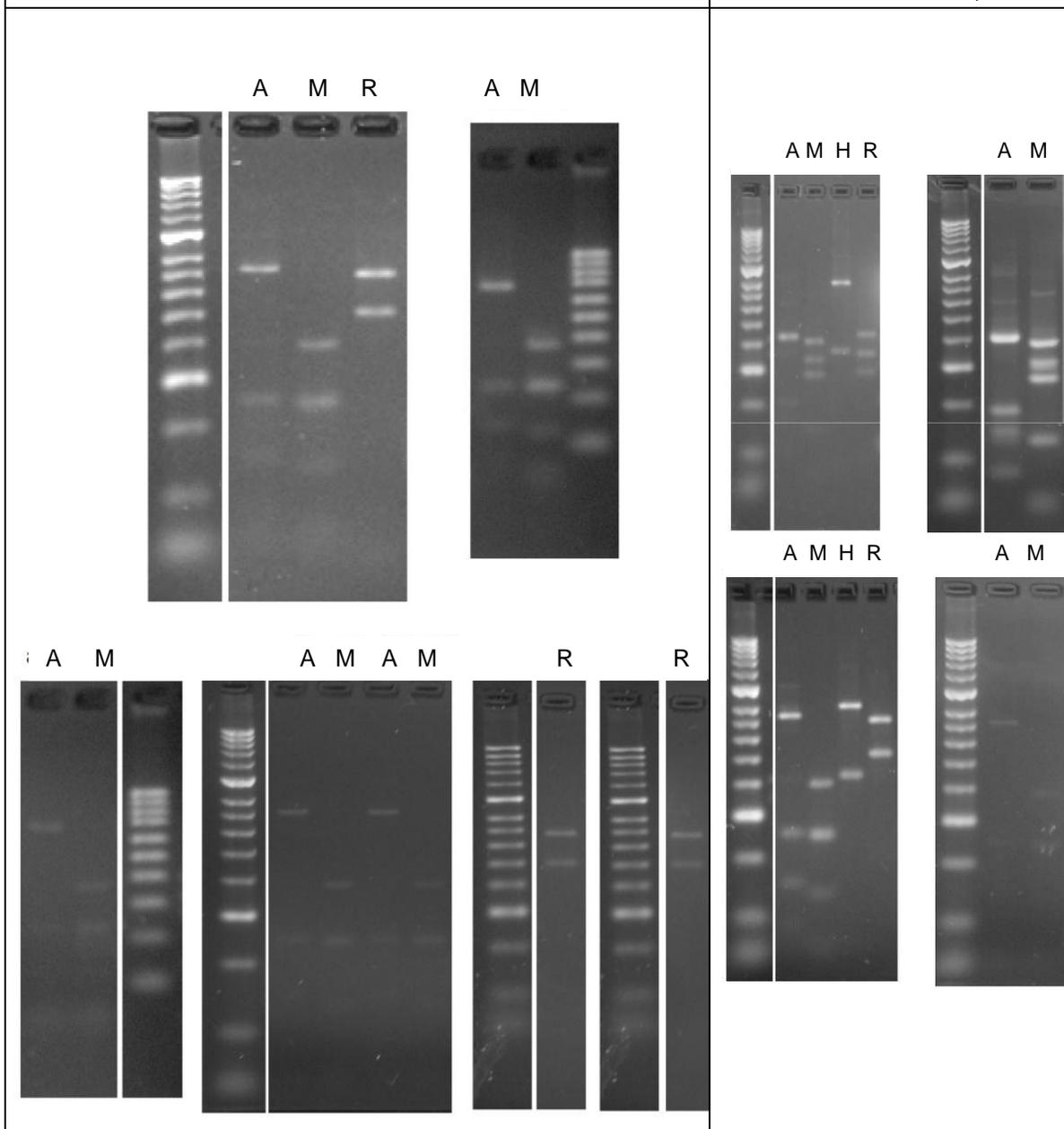
RFLP obtenido en PCR de ADN total de frijol luego de 13 semanas: TF5 y TF13

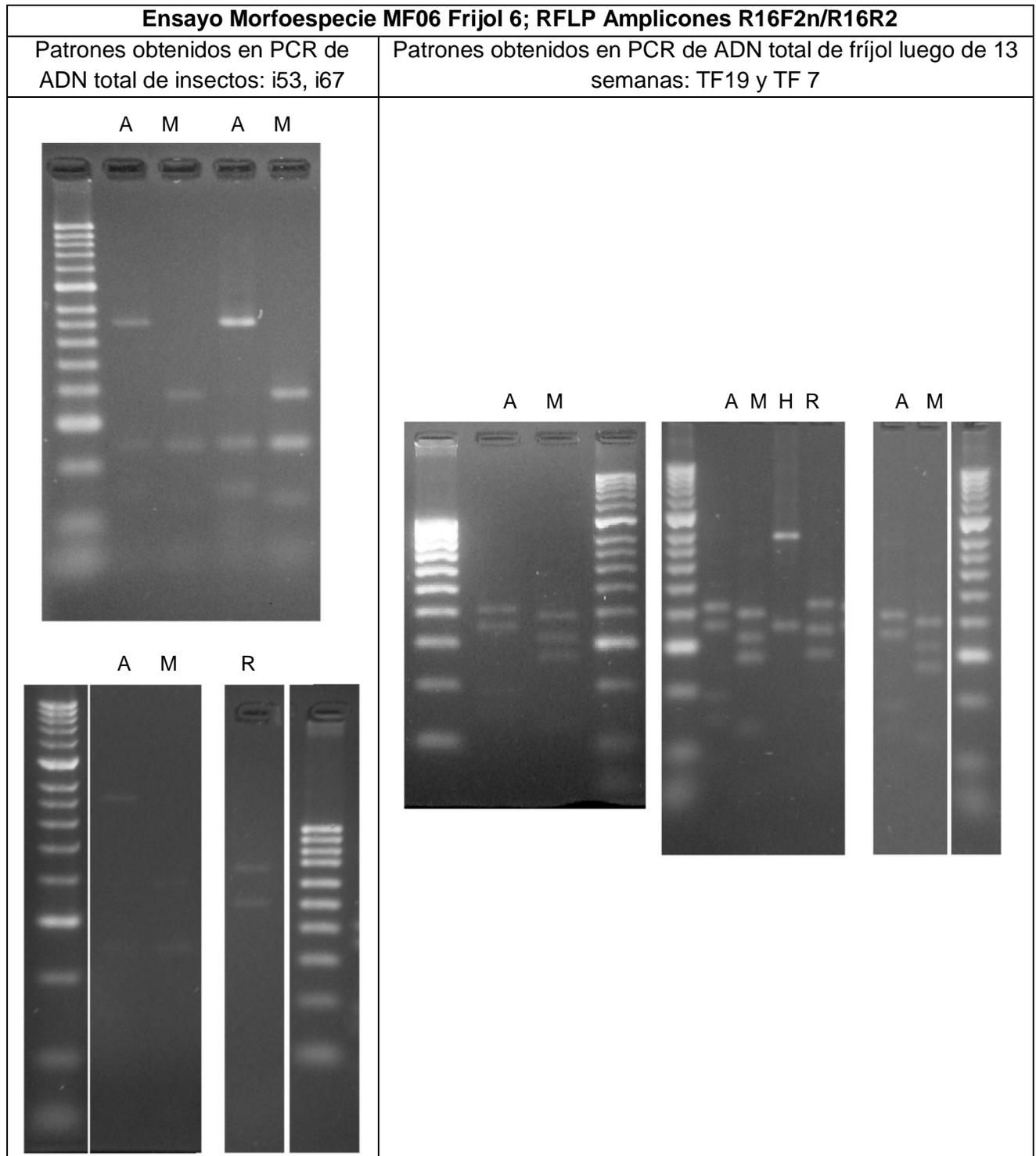


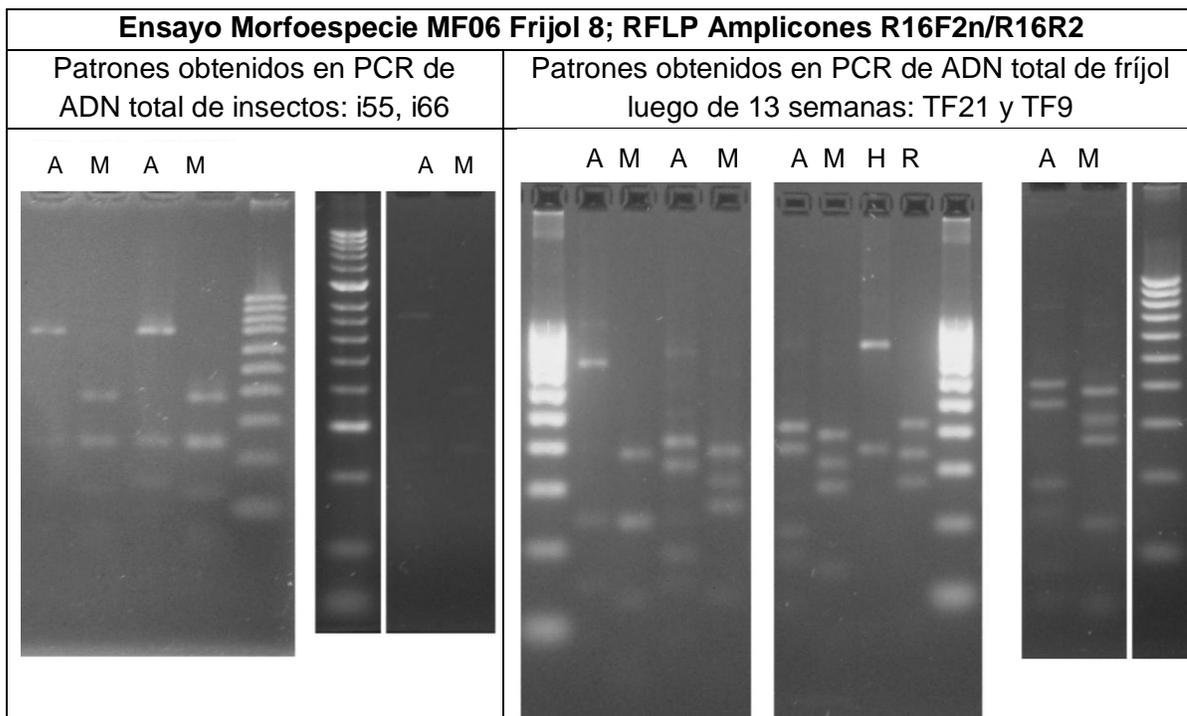
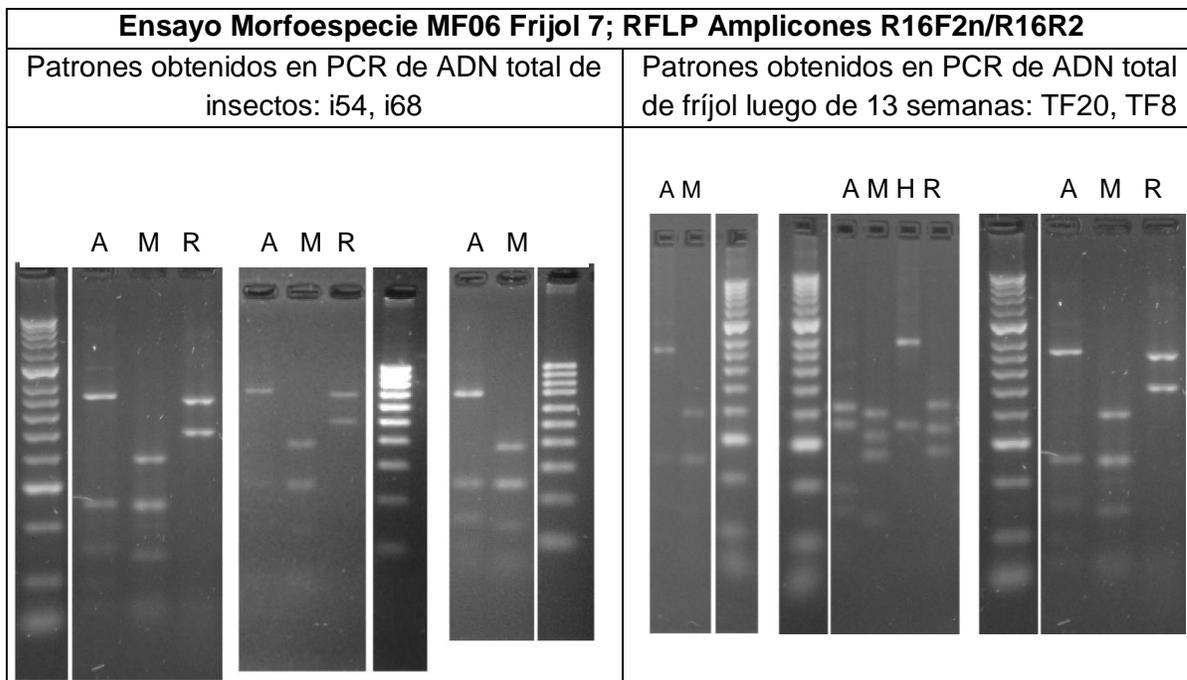
Ensayo Morfoespecie MF04 Frijol 5, RFLP Amplicones R16F2n/R16R2

Patrones obtenidos en PCR de ADN total de insectos: i49, i75, i76

Patrones obtenidos en PCR de ADN total de frijol luego de 13 semanas: TF6, TF14

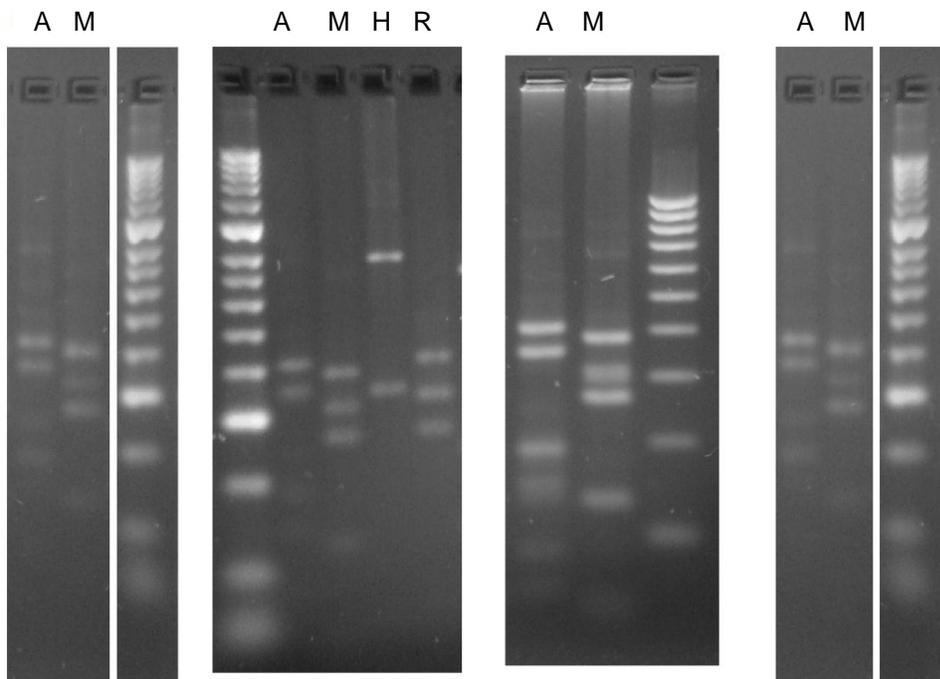






Ensayo Morfoespecie MF06 Frijol 9; RFLP Amplicones R16F2n/R16R2

Patrones obtenidos en PCR de ADN total de frijol luego de 13 semanas:
TF22, TF10



H. Anexo: Secuencia región amplificada Rnc-1/PssA1

>Contig M4

```
GCCGGGCTTTTTTTGCTAGCGGCTTTTTTAGTGCTGCCTTCACCTGTTCCCTAAAAGATTTTTTT  
CTAAATAAACTTCTGCTACAAAATTTTTAGAATGAGCAGGTCTTGCTCTTGACTATTTTTATAT  
TGGATAGTTTTTTTTCTGACTGAACTATTTCTTGTAATTGAGTTTTAAAATCAATAAGTATAGAT  
AATTTTGGCTAAGCGAGACATAGACAAAAGGGAACCGGGATAGAATACGTTTAATGGGTCTGT  
CCTGCAGCAGGGCGGAAAACAAAACCGAGAGGCCACGAGCAGTGGACGGCCGAATGTCGC  
GAGTCGTACCACGCCTGCCGTGCAGGAGGATGGAGCCGGCCGAACGCTTCCCCGCAAGG  
CAAACGAGGACGCATAGCGGAGCAAACCAGAGGGCGGCCAGCAGTAAAGTCAGGCTCCCGCC  
AACGCAGCCTGAGCACGCCGTGGTCCTCCAGCCAGGTGCACTCCGAATATACATACCTACGC  
GGGCAAAGGCTAGATCGCTTGACGGTCGAGAACACGCGTGGTGCACCGCGTTGTCAGCGGC  
AAGTCGAGCCCTGCGGCGTGAAGCCTTTATGCCAGGCAGGCATGAACACAAGGACGTGC  
AGCTGGCGCGGAGGAGGGAGCGGATTCGAGCGCGGCGGTGCGCTCCGATCCTGACCCGCA  
GCTGCGGGCCAGCCTTTGCGGTGCGAGGTCCGCTATAGTCGCCTGCGGTTGACCGGGCCGG  
GGAAACGCGAGGCCATCAGGCCAGCACCGCAGCGCCTGATCGCCCTGTGACGTAACGACGC  
CCTGCGGCAGACTGCGCGCACGAGTGGCCCCATGGCGGTGTGGCGATGAAGGGGCGCGAG  
GAGGTAACCGCAAGAGCAGAGCGCGGCACAGCGGACCGCATAGAGTACTGAGCGTCAATA  
ATGCTGGTAAAGAGGGCGACCCGGGGCCGGTAAAATATGTGCCATAATTATTTAGCATTAA  
AATCTTTGTTTTTTTCGCCTTTGCCTAAAAGAAGATAATTTTGCAATTTCAATGTTTGAGCGTAG  
ATGGGTAAGGCCCTCACACACC
```


I. Anexo: Ponencias y publicaciones



2012 APS
Annual Meeting
August 4-8
Providence, RI

2012 APS Annual Meeting Abstracts of Presentations

Abstracts submitted for presentation at the APS Annual Meeting in Providence, Rhode Island, August 4-8, 2012 (including abstracts submitted for presentation at the 2012 APS Northeastern Division Meeting). The abstracts are arranged alphabetically by the first author's name. Recommended format for citing annual meeting abstracts, using the first abstract below as an example, is as follows: Abbas, H. D., Shier, W., Weaver, M. A., and Horn, B. W. 2012. Detection of aflatoxigenic *Aspergillus flavus* contamination of coconut (*Cocos nucifera*) nutmeat (copra) using ammonia treatment. (Abstr.) *Phytopathology* 102(Suppl. 4):S4.1. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-102-7-S4.1>

... evolution of *M. graminicola* under continued selection by azole fungicides could involve multiple mechanisms. The prospects for azole fungicides in controlling European *M. graminicola* populations in the future are discussed in the context of these new findings.

Characterization of *Phoma* and *Phytophthora* isolates from chicory root
R. A. FRANCE (1), P. A. MILLAS (1)
(1) Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Chillán, Chile
Phytopathology 102:S4.41

Phytophthora cryptogea and *Phoma exigua* var. *exigua* has been identified as pathogens causing chicory root rot at field and post-harvest production. Chicory plants show different virulence at the field, indicating a possible variability of the pathogen populations. The objective was to determine the presence of variability and virulence in a collection of *P. cryptogea* and *P. exigua*, previously isolated from chicory plants showing root rot symptoms. Six *P. cryptogea* and 25 *P. exigua* isolates were transferred to PDA medium and incubated in growth chambers at 20, 25 and 30°C, colonies growth were measured every other day up to 7 days. Significant differences in response to the 30°C were observed only in *P. exigua*. Six isolated over 25 were able to grow at such temperature. Then, the same isolates were inoculated on chicory root discs with agar plug from an actively growing culture, then incubated in humid chamber at 25°C for 7 days. Diameter of rot was measured and a rot area calculated. Difference of 93% and 91% in root rot areas were detected among *P. exigua* and *P. cryptogea* isolates, respectively. Therefore, variability is present in both pathogens population affecting chicory root.

Genomic island-based plasticity among the genomes of rice-pathogenic *Burkholderia glumae* and *B. gladioli* strains
F. FRANCIS (1), J. Kim (2), J. Ham (1)
(1) Louisiana State University Agricultural Center, Baton Rouge, LA, U.S.A.;
(2) Louisiana State University, Center for Computation & Technology, Baton Rouge, LA, U.S.A.
Phytopathology 102:S4.41

Phytopathogenic *Burkholderia* species are the etiological agents of diseases for diverse flora and cause symptoms such as blight, wilt and rot. *Burkholderia glumae* and *B. gladioli* are important causal agents of bacterial panicle blight of rice, which is becoming an increasingly significant problem in global rice production. To better understand its genome-scale characteristics, the genome of the highly virulent *B. glumae* strain 336gr-1, isolated from Louisiana, was sequenced using Illumina Genome Analyser II. The 336gr-1 genome was aligned and compared with the previously sequenced genomes of *B. glumae* strain BGR1 and *B. gladioli* strain BSR3, which were isolated from infected rice plants in South Korea. Comparative analyses among the three strains revealed unique regions present in their genomes. Many of these unique regions correspond to genomic islands that contain mobile elements such as phage-related genes. A significant amount of plasticity was observed in these closely related strains of *Burkholderia* that are

Detection of phytoplasmas in Cicadellidae morphotypes of Bogotá, Colombia

L. FRANCO-LARA (1), L. PERILLA (1)
(1) Universidad Militar Nueva Granada, Bogotá, Colombia
Phytopathology 102:S4.41

Phytoplasmas of groups 16Sr1 and 16SrVII are known to exist in ornamental urban trees in Bogotá, such as *Fraxinus uhdei*, *Liquidambar styraciflua*, *Pittosporum undulatum*, *Populus nigra* and *Croton* spp. Other species as *Magnolia grandiflora*, *Eugenia* sp. and *Acacia melanoxylon* display symptoms and are being tested for phytoplasmas. The insect vectors of these phytoplasmas are unknown in the region. In 2011, leafhoppers were collected and grouped in 12 groups according to morphological characteristics; these groups varied in abundance and frequency of collection. Pooled samples from 1 to 5 insects were tested by nested PCR and 16SrDNA was amplified with primers P1A/P7A - R16F2n/R16R2 - fU5/U3. So far, 3 morphotypes were positive and 9 were negative for the presence of phytoplasmas. Positive amplicons were cloned, sequenced and contigs were aligned; dendrograms were built using previously reported sequences. Sequences are related with Group 16Sr1 phytoplasmas strains. All three leafhopper morphotypes carrying phytoplasmas belong to subfamily Deltocephalinae; further taxonomic identification is in process, but there is little information about these taxa in Colombia. Group 16SrVII phytoplasmas have been elusive but more extensive tests are being applied. Previous evidence indicates that insect vectors are polyphagous and very efficient vectors. Currently transmission trials are being carried to evaluate the vector ability of these morphotypes.

Survival of *Colletotrichum acutatum*, the causal agent of citrus postbloom fruit drop, on weeds

G. F. FRARE (1), L. AMORIM (1)
(1) Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/Universidade de São Paulo, Piracicaba, Brazil
Phytopathology 102:S4.41

Citrus postbloom fruit drop (PFD), caused by *Colletotrichum acutatum* is an important disease that causes significant yield reduction. *C. acutatum* can survive on the surface of citrus leaves, in the form of quiescent appressoria. The weeds can act as alternative hosts of diverse pathogens, serving as inoculum sources and playing an important role in the disease epidemiology. The objective of this work was to verify if weeds frequently found in citrus orchards in São Paulo State may serve as inoculum source of *C. acutatum* for this crop. Seven weed species were inoculated with a conidial suspension of *C. acutatum*. Thirty six hours after the inoculation, samples of all weeds were collected and observed in optical microscope to verify the conidia germination. Thirty, sixty and ninety days after inoculation, *C. acutatum* was isolated from the inoculated leaves and inoculated on citrus flower. Conidia germination and appressoria formation of *C. acutatum* were observed in all inoculated leaves. There was no statistical difference in the *C. acutatum* survival rate during 30, 60 and 90 days, for each weed species. No symptoms were

Plant Disease - 96(9):1372 - Abstract Página 1 de 2

Welcome Sign in | Register



The premier source for peer-reviewed plant pathology research since 1911.

[Journals Home](#) | [APSnet](#) | [IS-MPMInet](#) | [My Profile](#) | [Help](#) | [Subscribe](#) | [Search](#) | [Advanced Search](#)

[Subscribe](#) | [Free alerts](#) | [RSS](#)

About the cover for September 2012

ISSN: 0191-2917

SEARCH

Enter Keywords

Phytopathology

Plant Disease

MPMI

[Advanced Search](#)

Inside the Journal

BACK ISSUES
(Issues before 1997)

First Look

View Most Downloaded Articles

About Plant Disease

Editorial Board

Submit a Manuscript

Author Instructions

Policies/Procedures

Online e-Xtras

= "Open" Access

plant disease

Editor-in-Chief: R. Michael Davis
Published by The American Phytopathological Society

Home > Plant Disease > Table of Contents > Abstract

[Previous Article](#) | [Next Article](#)

September 2012, Volume 96, Number 9
 Page 1372
<http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-03-12-0290-PDN>

Disease Notes

First Report of 'Candidatus Phytoplasma asteris' Affecting Woody Hosts (*Fraxinus uhdei*, *Populus nigra*, *Pittosporum undulatum*, and *Croton* spp.) in Colombia

L. M. Perilla-Henao, Facultad de Ciencias, Universidad Militar Nueva Granada, Km3 via Cajica-Zipaquira, Cajicá-Colombia; **M. Dickinson**, School of Biosciences, The University of Nottingham, Sutton Bonington Campus, Loughborough LE12 5RD, UK; and **L. Franco-Lara**, Facultad de Ciencias, Universidad Militar Nueva Granada, Km3 via Cajica-Zipaquira, Cajicá-Colombia

Phytoplasmas of the 16SrVII group in ornamental *Fraxinus uhdei* trees (1) growing in different cities of the Colombian Andes have been reported (2). In surveys made in Bogotá during March and May 2011, symptoms suggestive of phytoplasma infection were observed in ornamental woody species: *Croton* spp. (Euphorbiaceae), *Pittosporum undulatum* (Pittosporaceae) and *Populus nigra* (Salicaceae) trees, growing close to infected *F. uhdei* (Oleaceae). Symptoms included witches' broom, yellowing, dieback, epicormic sprouts, tufted foliage, abnormal elongation or shortening of internodes, and deliquescent branching leading to dramatic changes in crown architecture. *P. undulatum* and *F. uhdei* are introduced species representing the second and third most abundant trees in the city. *P. nigra* is an introduced species and *Croton* spp. is an Andean genus. In order to screen for the presence of phytoplasmas in *Croton* spp., *P. undulatum*, and *P. nigra*, four individuals of each species and two *F. uhdei* trees were sampled. For DNA extraction, 1 g of vascular tissue from young stems was used. Samples were tested by nested PCR with primers P1A/P7A (4) followed by R16F2n/R16R2 (3). The frequency of phytoplasma detection varied among species; *P. undulatum* and *Croton* spp. had three positives each, while *P. nigra* had one positive. Both *F. uhdei* were positive. Sequences from the amplicons (three reads) were aligned. BLAST analysis of 16S rDNA sequences from the four species tested had 99.2 to 99.7% similarity to 16SrI group sequences. Phylogenetic analysis further confirmed this relationship. Virtual sequence analysis using the PhyClassifier tool (<http://plantpathology.ba.ars.usda.gov/cgi-bin/resource/phyclassifier.cgi>) showed that the sequence derived from *P. undulatum* (JQ730861) produced an identical RFLP pattern to group 16SrI-B (reference sequence NC_005303). RFLP similarity coefficients of the phytoplasmas from *F. uhdei*, *Croton* spp., and *P. nigra* (JQ730859, JQ730859 and JQ730861) were less than 0.97, suggesting the presence of a new subgroup within group 16SrI.

Quick Links

[Add to favorites](#)

[E-mail to a colleague](#)

[Alert me when new articles cite this article](#)

[Download to citation manager](#)

[Related articles found in APS Journals](#)

Plant Disease - 96(9):1372 - Abstract Página 2 de 2

The vectors of phytoplasmas are unknown in the region. Phytoplasma hosts previously reported in Colombia are: *Solanum quitoense* (16SrIII), *Manihot esculenta* (16SrIII), *Liquidambar styraciflua* (16SrI and 16SrVII), *Elaeis guineensis* (16SrI and 16SrIII), *Coffea arabica* (16SrIII), *Cordia alliodora* (16SrIII), *Solanum tuberosum* (16SrV and 16SrXII), and *Zea mays* (16SrI). To our knowledge, this is the first report of *Croton* spp. and *P. undulatum* as phytoplasma hosts. Phytoplasmas of group 16SrI are known to infect more than 100 species of different families worldwide. Detection of this group in several tree species and the observation of similar symptoms in other trees species raises concerns about a possible epidemic affecting plants in the Andean region. Implications are at several levels: i) epidemiological, with infected trees representing a potential inoculum source for other ornamental plants or crops growing in the agricultural surrounding areas; ii) economic, since eventually it will be necessary to replace diseased plants; and iii) environmental, because of the negative impact on the services provided by trees and green areas.

References: (1) J. J. Filgueira et al. Plant Pathology 53:520, 2004. (2) L. Franco-Lara et al. Fitopatología Colombiana 29:32, 2005. (3) D. E. Gundersen et al. Phytopathol. Mediterr. 35:144, 1996. (4) I-M. Lee et al. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54:1037, 2004.



British Society for Plant Pathology

Education Award

This is to certify that
Laura Margarita Perilla Henao
has been awarded a
BSPP MSc Bursary titled
Detection of phytoplasmas in insects and ornamental
plant species from Bogotá, Colombia.

Signed on behalf of the BSPP education officer

Bibliografía

- ADKAR-PURUSHOTHAMA C.R., QUAGLINO F., P.CASATI y BIANCO P.A. **2011**. Molecular typing of Coorg black pepper yellows phytoplasma by multiple gene analyses. *Annals Applied Biology* 159: 58–68.
- ALTSCHUL S F., T. L. MADDEN, A. A. SCHÄFFER, J. ZHANG, Z. ZHANG, W. MILLER, y D. J. LIPMAN. **1997**. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Research*. 25: 3389-3402.
- ÁLVAREZ, E., MEJÍA, J. F., LLANO, G. A., LOKE, J. B., CALARI, A., DUDUK, B., y BERTACCINI, A. **2009**. Characterization of a phytoplasma associated with frogskin disease in cassava. *Plant Disease* 93:1139-1145.
- ARASHIDA, R., KAKIZAWA, S., ISHII, Y., HOSHI, A., JUNG, H.-Y., KAGIWADA, S., YAMAJI, Y., OSHIMA, K., y NAMBA, S. **2008**. Cloning and characterization of the antigenic membrane protein (*Amp*) gene and in situ detection of Amp from malformed flowers infected with Japanese hydrangea phyllody phytoplasma. *Phytopathology* 98:769-775.
- ARISMENDI N., GONZÁLEZ F., ZAMORANO A., ANDRADE N., PINO A. M. y FIORE N. **2011**. Molecular identification of '*Candidatus Phytoplasma fraxini*' in murta and peony in Chile. *Bulletin of Insectology* 64 (Supplement): S95-S96.
- ARNAUD, G., MALEMBIC-MAHER, S., SALAR, P., BONNET, P., MAIXNER, M., MARCONE, C., BOUDON-PADIEU, E. y FOISSAC, X. **2007**. Multilocus sequence typing confirms the close genetic interrelatedness of three distinct Flavescence doree phytoplasma strain clusters and group 16SrV phytoplasmas infecting grapevine and alder in Europe. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 4001–4010.
- AROCHA, Y., LOPEZ, M., FERNANDEZ, M., PINOL, B., HORTA, D., PERALTA, E. L., ALMEIDA, R., CARVAJAL, O., PICORNELL, S., WILSON, M. R. y JONES, P. **2005**. Transmission of a sugarcane yellow leaf phytoplasma by the delphacid planthopper *Saccharosydne saccharivora*, a new vector of sugarcane yellow leaf síndrome. *Plant Pathology* 54: 634–642.
- BAI X., ZHANG J., EWING A., MILLER S. A., JANCOSO R. A., SHEVCHENKO D. V., TSUKERMAN K., WALUNAS T., LAPIDUS A., CAMPBELL J. W. y HOGENHOUT S. A. **2006**. Living with Genome Instability: the Adaptation of Phytoplasmas to Diverse Environments of Their Insect and Plant Hosts. *Journal of Bacteriology*, 188: 3682–3696

- BAI X., V. R. CORREA, T. Y. TORUÑO, E. AMMAR, S. KAMOUN y S. A. HOGENHOUT. **2009**. AY-WB Phytoplasma Secretes a Protein That Targets Plant Cell Nuclei. *Molecular Plant Microbe Interaction* 22 (1): 18–30.
- BARBARA D. J., MORTON A., CLARK M. F. AND DAVIES D. L. **2002**. Immunodominant membrane proteins from two phytoplasmas in the aster yellows clade (chlorate aster yellows and clover phyllody) are highly divergent in the major hydrophilic region. *Microbiology* 148: 157–167.
- BATLLE A., ALTABELLA N., SABATE J. Y LAVIÑA A. **2008**. Study of the transmission of stolbur phytoplasma to different crop species, by *Macrosteles quadripunctulatus*. *Annals Applied Biology*. 152: 235–242.
- BEKELE B, HODGETTS J., TOMLINSON J., BOONHAM N., NIKOLIC P., SWARBRICK P. AND DICKINSON M. **2011**. Use of a real-time LAMP isothermal assay for detecting 16SrII and XII phytoplasmas in fruit and weeds of the Ethiopian Rift Valley. *Plant Pathology*. 60: 345–355.
- BELLI G., BIANCO P.A. and M. CONTI. **2010**. Grapevine Yellows In Italy: Past, Present And Future. *Journal of Plant Pathology*. 92 (2): 303-326.
- BERGES B, M.-T.COUSIN, J. ROUX, R. MAURER y E. SEEMULLER. **1997**. Detection of phytoplasma infections in declining *Populus nigra* 'Italica' trees and molecular differentiation of the aster yellows phytoplasmas identified in various *Populus* species. *European Journal for Pathology*. 27: 33-43.
- BERTACCINI A. **2007**. Phytoplasmas: diversity, taxonomy, and epidemiology. *Frontiers Bioscience*. 12:673–689.
- BERTACCINI A. y DUDUK B. 2009. Phytoplasma and phytoplasma diseases: a review of recent research. *Phytopathologia Mediterranea* 48: 355–378.
- BERTOLINI, EL., TORRES, E., OLMOS, A., MARTIN, M.P., BERTACCINI, A. y CAMBRA, M.**2007**. Co-operational PCR coupled with dot blot hybridization for detection and 16SrX grouping of phytoplasmas. *Plant Pathology*. 56: 677-682.
- BETANCOURT M. y VILLAMAR C. **2004**. Identificación de vectores del machorreo del lulo y aproximación al diagnóstico de la enfermedad. *Boletín Investigaciones UNISARC*. 2(2): 9-15.
- BLOMQUIST C. L., BARBARA D., DAVIES D. L., CLARK M. F. y B. C. KIRKPATRICK. **2001**. An immunodominant membrane protein gene from the Western X-disease phytoplasma is distinct from those of other phytoplasmas. *Microbiology* 147: 571–580
- BOSCO D. y D'AMELIO R. **2010**. Transmission specificity and Competition of Multiple Phytoplasmas in the insect vector. Capítulo 16 Libro, Phytoplasmas: Genomes, Plant Hosts and Vectors *CAB international* (eds P. G. Weintraub and P. Jones). p. 300.
- BRUNI, R., PELLATI, F., BELLARDI, M.G., BENVENUTI, S., PALTRINIERI, S., BERTACCINI, A. y BIANCHI, A. **2005**. Herbal Drug Quality and Phytochemical

- Composition of *Hypericum perforatum* L. Affected by Ash Yellows Phytoplasma Infection. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 53: 964 -968.
- CARRARO L., LOI N. y ERMACORA P. **2001**. Transmission characteristics of the European stone fruit yellows phytoplasma and its vector *Cacopsylla pruni*. *European Journal of Plant Pathology* 107: 695–700.
- CHRISTENSEN N. M., K. B. AXELSEN, M. NICOLAISEN y A. SCHULZ. **2005**. Phytoplasmas and their interactions with hosts. *Trends in plant science*. 10 (11): 526-535.
- CHRISTENSEN N. M., NICOLAISEN M, HANSEN M., y SCHULZ A. **2004**. Distribution of Phytoplasmas in Infected Plants as Revealed by Real-Time PCR and Bioimaging. *Molecular Plant Microbe Interaction*. 17(11): 1175–1184
- CHUNG W-C., CHEN L-L., LO W-S., LIN C-L., KUO C-H. **2013**. Comparative Analysis of the Peanut Witches´-Broom Phytoplasma Genome Reveals Horizontal Transfer of Potential Mobile Units and Effectors. *PLoS ONE* 8(4): e62770.
- CONCI L, N. MENEGUZZI E., GALDEANO L., TORRES C., y NOMES N. **2005**. Detection and molecular characterization of an alfalfa phytoplasma in Argentina that represents a new subgroup in the 16S rDNA Ash Yellows group ('*Candidatus* Phytoplasma fraxini'). *European Journal of Plant Pathology*. 113:255–265
- CONTALDO N., BERTACCINI A., PALTRINIERI S., WINDSOR H. M. y WINDSOR G. D. **2012**. Axenic culture of plant pathogenic phytoplasmas. *Phytopathologia Mediterranea*. 51, 3, 607–617
- CRUZ, M. **2004**. Clonación del fragmento P1/Tint de fitoplasmas Ash Yellows de Norteamérica. Trabajo de Iniciación Científica. Biología Aplicada. Universidad Militar Nueva Granada
- DAVIS R. E. y SINCLAIR W. A. **1998**. Phytoplasma identity and disease etiology. *Phytopathology*, 88(12): 1372–1376.
- DAVIS RE, ZHAO Y, DALLY EL, JOMANTIENE R, LEE IM, WEI W y KITAJIMA EW. S. **2012**. '*Candidatus* Phytoplasma sudamericanum', a novel taxon, and strain PassWB-Br4, a new subgroup 16SrIII-V phytoplasma, from diseased passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.). *International Journal Systematic Evolutionary Microbiology*. 62 (Pt 4):984-9.
- DAVIS RE, ZHAO Y, DALLY EL, LEE IM, JOMANTIENE R. y DOUGLAS SM. **2013**. '*Candidatus* Phytoplasma pruni', a novel taxon associated with X-disease of stone fruits, *Prunus* spp.: multilocus characterization based on 16S rRNA, *secY*, and ribosomal protein genes. *International Journal Systematic Evolutionary Microbiology*, 63(Pt 2):766-76
- DIETRICH C. H. **2005**. Keys To The Families Of Cicadomorpha And Subfamilies And Tribes Of Cicadellidae (HEMIPTERA: AUCHENORRHYNCHA). *Florida Entomologist* 88 (4) 502-517.

- DUDUK B. y BERTACCINI A. **2011**. Phytoplasma classification: Taxonomy based on 16S ribosomal gene, is it enough?. *Phytopathogenic Mollicutes*. 1(1): 3-13.
- FAVALI, M.A., MUSETTI, R., BENVENUTI, S., BIANCHI, A. y PRESSACCO, L. **2004**. *Catharanthus roseus* L. plants and explants infected with phytoplasmas: alkaloid production and structural observations. *Protoplasma* 223: 45–51.
- FILGUEIRA J.J., FRANCO-LARA L., SALCEDO J.E. GAITAN S.L. y BOA E.R. **2004**. Urapán (*Fraxinus udhei*) dieback a new disease associated with a phytoplasma in Colombia. The British Society for Plant Pathology. *New Disease Report*. URL: <http://www.bspp.org.uk/ndr/july2004/2004-11.asp>
- FIRRAO G., GIBB K., STRETEN C. **2005**. SHORT TAXONOMIC GUIDE TO THE GENUS ‘ CANDIDATUS PHYTOPLASMA ’. *Journal of Plant Pathology*, 87 (4, Special issue): 249-263.
- FLETCHER, J., WAYADANDE, A., MELCHER, U., y YE, F. **1998**. The phytopathogenic mollicute-insect vector interface: A closer look. *Phytopathology* 88:1351-1358.
- FONTANIELLA B., VICENTE C., LEGAZ M. E., DE ARMAS R., RODRÍGUEZ C. W., MARTÍNEZ M., PIÑÓN D., ACEVEDO R. y SOLAS M. T. **2003**. Yellow leaf síndrome modifies the composition of sugarcane juices in polysaccharides, phenols and polyamines. *Plant physiology and Biochemistry*, 41: 1027-1036.
- FRANCO-LARA, L. y FILGUEIRA, J.J. **2005**. Síntomas de decaimiento del Urapán (*Fraxinus* sp) en Colombia. *Fitopatología Colombiana* 29: 32-38.
- FRANCO-LARA, L., CONTALDO, N., MARTINEZ, C., CALARI, A., PALTRINIERI, S., DUDUK, B. y BERTACCINI, A. **2010**. Complex phytoplasma infection in declining liquidambar trees in Colombia. Abstract Book 18th Congress International Organization for Mycoplasmaology, Chianciano Terme Italy July 2010.
- FREYTAG P. H. y SHARKEY M. J. **2002**. A preliminary list of the leafhoppers (Homoptera: Cicadellidae) of Colombia. *Biota Colombiana* 3 (2) 235 – 283.
- GAITÁN S. **2003**. Detección y caracterización molecular de fitoplasmas tipo “Ash Yellows” en Urapanes de Bogotá. Tesis de maestría. Postgrado Interfacultades en Microbiología. Universidad Nacional de Colombia.
- GALVIS, C. A., LEGUIZAMÓN, J. E., GAITÁN, Á. L., MEJÍA, J. F., ÁLVAREZ, E., y ARROYAVE, J. **2007**. Detection and identification of a 16SrIII-related phytoplasma associated with coffee crispiness disease in Colombia. *Plant Disease*. 91: 248-252.
- GIBB K., y PADOVAN A. **1994**. A DNA Extraction Method that Allows Reliable PCR Amplification of MLO DNA from “Difficult” Plant Host Species. *PCR Methods and Applications*. 4: 56-58.
- GRIFFITHS H.M., BOA E.R. y FILGUEIRA J.J. **2001**. Ash yellows disease of *Fraxinus chinensis* in Colombia. (Abstract) *Phytopathology* 91: S32–S33

- GRIFFITHS, H.M., SINCLAIR, W.A., SMART, D.C. y DAVIS, R.E. **1999**. The phytoplasma associated with ash yellows and lilac witches'-broom: '*Candidatus* Phytoplasma Fraxini'. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49: 1605-1614.
- GUNDERSEN, D.E., y LEE, I.M. **1996**. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal initiator pairs. *Phytopathology Mediterranea* 35: 144-151.
- GUTIÉRREZ C. **2006**. Variabilidad molecular de fitoplasmas asociados a Fraxinus sp. en Colombia. Tesis de maestría. Postgrado Interfacultades en Microbiología. Universidad Nacional de Colombia.
- HILL, G. T. and SINCLAIR W. A. **2000**. Taxa of leafhoppers carrying phytoplasmas at sites of ash yellows occurrence in New York State. *Plant Disease*. 84:134-138.
- HODGETTS J., CHUQUILLANGUI C., MULLER G., AROCHA Y., GAMARRA D., PINILLOS O., VELIT E., LOZADA P., BOA E., BOONHAM N., MUMFORD R., BARKER I. AND DICKINSON M. **2009**. Surveys reveal the occurrence of phytoplasmas in plants at different geographical locations in Peru. *Annals Applied Biology*. 155: 15–27.
- HODGETTS J., N. BOONHAM, R. MUMFORD, N. HARRISON AND M. DICKINSON. **2008**. Phytoplasma phylogenetics based on analysis of *secA* and 23S rRNA gene sequences for improved resolution of candidate species of '*Candidatus* Phytoplasma'. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58: 1826–1837.
- HODGETTS, J., BALL, T., BOONHAM, N., MUMFORD, R., and DICKINSON, M. **2007**. Use of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) for identification of phytoplasmas in plants. *Plant Pathology* 56: 357–365.
- HOGENHOUT S. A. y LORIA R. **2008**. Virulence mechanisms of Gram-positive plant pathogenic bacteria. *Current Opinion in Plant Biology*, 11: 449-456.
- HOGENHOUT SA, OSHIMA K, AMMAR ED, KAKIZAWA S, KINGDOM HN y NAMBA, S. **2008**. Phytoplasmas: bacteria that manipulate plants and insects. *Molecular Plant Pathology* 9: 403-423.
- HOSHI A., OSHIMA K., KAKIZAWA S., ISHIIA Y., OZEKI J., HASHIMOTO M., KOMATSU K., KAGIWADA S., YAMAJI Y., y NAMBA S. **2009**. A unique virulence factor for proliferation and dwarfism in plants identified from a phytopathogenic bacterium. *PNAS* 106 (15): 6416-6421.
- HOWE A. y JANDER G. **2008**. Plant Immunity to Insect Herbivores. *Annual Review Plant Biology*. 59: 41–66.
- HUNG T.H., HUNG S.C., CHEN C.N., HSU M.H. and SU H.J. **2004**. Detection by PCR of '*Candidatus* Liberibacter asiaticus', the bacterium causing citrus huanglongbing in vector psyllids: application to the study of vector-pathogen relationships. *Plant Pathology* 53: 96-102.

- IRPCM PHYTOPLASMA/SPIROPLASMA WORKING TEAM-PHYTOPLASMA. **2004**. 'Candidatus Phytoplasma', a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54: 1243–1255.
- JBB (JARDÍN BOTÁNICO JOSÉ CELESTINO MUTIS). **2007**. Censo del Arbolado Urbano. *Informe Plan Local de Arborización Urbana*. Alcaldía Mayor de Bogotá.
- JI X., Y. GAI, B. LU, C. ZHENG AND Z. MU. **2010**. Shotgun proteomic analysis of mulberry dwarf phytoplasma. *Proteome Science* 8:20
- KAKIZAWA S, K. OSHIMA, H. NISHIGAWA, H-Y. JUNG, W. WEI, S. SUZUKI, M. TANAKA, S. MIYATA, M. UGAKI and S. NAMBA. **2004**. Secretion of immunodominant membrane protein from onion yellows phytoplasma through the Sec protein-translocation system in *Escherichia coli*. *Microbiology*, 150: 135–142.
- KAKIZAWA S., OSHIMA K., JUNG H-Y, SUZUKI S., NISHIGAWA H., ARASHIDA R. , MIYATA S-I, UGAKI M., KISHINO H., AND NAMBA. **2006**. Positive Selection Acting on a Surface Membrane Protein of the Plant-Pathogenic Phytoplasmas. *Journal Of Bacteriology*, 188 (9): 3424–3428.
- KAKIZAWA, K. OSHIMA, Y ISHII, A. HOSHI, K. MAEJIMA, H-Y.JUNG, Y. YAMAJI Y S. NAMBA. **2009**. Cloning of immunodominant membrane protein genes of phytoplasmas and their *in planta* expression. *FEMS Microbiology Letter* 293: 92–101.
- KISON, H. AND 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. *Journal of Phytopathology* 149: 533–541.
- KUBE, M., SCHNEIDER, B., KUHL, H., DANDEKAR, T., HEITMANN, K., MIGDOLL, A.M., REIN- HARDT, R. and SEEMÜLLER, E. **2008**. The linear chromosome of the plant-pathogenic mycoplasma 'Ca. *P. mali*'. *BMC Genomics* 9, 306.
- LEE I. M., DAVIS R. E. and GUNDERSEN-RINDAL D. E. **2000**. Phytoplasma: Phytopathogenic Mollicutes. *Annual Review Microbiology*. 54: 211-55.
- LEE I.-M., D. E. GUNDERSEN-RINDAL, R. E. DAVIS, K. D. BOTTNER, C. MARCONE AND E. SEEMULLER. **2004**. 'Candidatus Phytoplasma asteris', a novel phytoplasma taxon associated with aster yellows and related diseases. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54: 1037–1048.
- LEE I.M., Y. ZHAO, K.D. BOTTNER. **2006**. *SecY* gene sequence analysis for finer differentiation of diverse strains in the aster yellows phytoplasma group. *Molecular and Cellular Probes* 20: 87–91.
- LEE, I.M; GUNDERSEN, D.E. Y BERTACCINI, A. **1998**. Phytoplasma: Ecology and genomic diversity. *Phytopathology*, 88: 1359-1366.
- LIM, P.-O., SEARS, B. B. and KLOMPARENS, K. L. **1992**. Membrane properties of a plant-pathogenic mycoplasma-like organism. *Journal Bacteriology* 174, 682–686.

- LÓPEZ K. Y FILGUEIRA, J.J. **2006**. Infección y concentración de fitoplasmas tipo AshY en periwinkle (*Catharanthus roseus*), a partir de árboles de *Fraxinus* sp. Infectados. 2006. *Revista Facultad de Ciencias Básicas Universidad Militar Nueva Granada* 2: 123-128.
- MAIXNER M, WEINTRAUB P, JARAUSCH B. **2010**. Grapevine Yellows Vector sampling and Monitoring Training School Bernkastel-Kues, Germany 5th to 9th of July, 2010 *Reporte COST Action 0807 Working Group 2 - Insect vectors*
- MARCONE C. **2010**. Movement of Phytoplasmas and the Development and Movement of Disease in the Plant. Capítulo 7 Libro, *Phytoplasmas: Genomes, Plant Hosts and Vectors CAB international* (eds P. G. Weintraub and P. Jones) p 114- 131.
- MARCONE C. **2012**. Advances in differentiation and classification of phytoplasmas. *Annals of Applied Biology*. 201–203
- MARCONE, C., LEE, I.-M., DAVIS, R.E., RAGOZZINO, A. y SEEMÜLLER, E. **2000**. Classification of aster yellows-group phytoplasmas based on combined analyses of rRNA and *tuf* gene sequences. *International Journal Systematic Evolutionary Microbiology* 50: 1703-1713.
- MARCONE, C; NEIMARK, H; RAGOZZINO, A. y SEEMULLER, E. **1999**. Chromosome sizes of phytoplasmas composing major phylogenetic groups and subgroups. *Phytopatology* 89: 805-810.
- MARTINI M, MARCONE C, MITROVIĆ J, MAIXNER M, DELIĆ D, MYRTA A, ERMACORA P, BERTACCINI A. y DUDUK B. **2012**. 'Candidatus Phytoplasma convolvuli', a new phytoplasma taxon associated with bindweed yellows in four European countries *International Journal Systematic Evolutionary Microbiology*. 62(Pt 12): 2910-5.
- MARTINI, M, LEE, I-M, BOTTNER, K D, ZHAO, Y, BOTTI, S, BERTACCINI, A HARRISON, N A, CARRARO, L, MARCONE, C, KHAN, A J, OSLER, R. **2007**. Ribosomal protein gene-based phylogeny for finer differentiation and classification of phytoplasmas. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 57, 2037–2051
- MAYER C. J., A. VILCINSKAS y GROSS J. **2010**. Chemically mediated multitrophic interactions in a plant–insect vector-phytoplasma system compared with a partially nonvector species. *Agricultural and Forest Entomology* 13 (1): 25-35
- MEJIA J. F., CONTALDO N., PALTRINIERI S., PARDO J. M., RIOS C. A., ALVAREZ E., BERTACCINI A. **2011**. Molecular detection and identification of group 16SrV and 16SrXII phytoplasmas associated with potatoes in Colombia. *Bulletin of Insectology* 64 (Supplement): S97-S98.
- MITCHELL P. L. **2004**. Heteroptera as Vectors of Plant Pathogens. *Neotropical Entomology* 33(5): 519-545.

- MITROVIĆ J., PALTRINIERI S., CONTALDO N., BERTACCINI A., DUDUK B. **2011**. Occurrence of two 'Candidatus Phytoplasma asteris'-related phytoplasmas in poplar trees in Serbia. *Bulletin of Insectology* 64 (Supplement): S57-S58.
- MITROVIĆ, J., KAKIZAWA, S., DUDUK, B., OSHIMA, K., NAMBA, S., BERTACCINI, A. **2011**. The *groEL* gene as an additional marker for finer differentiation of 'Candidatus Phytoplasma asteris'-related strains. *Annals Applied Biology* 159: 41–48.
- MORTON, A., DAVIES, D. L., BLOMQUIST, C. L. and BARBARA, D. J. **2003**. Characterization of homologues of the apple proliferation immunodominant membrane protein gene from three related phytoplasmas. *Molecular Plant Pathology* 4: 109–114.
- MUSETTI R. AND FAVALI M.A. **2004**. Microscopy Techniques Applied to the Study of Phytoplasma Diseases: Traditional and Innovative Methods. *Current Issues on Multidisciplinary Microscopy Research and Education*. pp. 72-80
- NADARASAH G. y STAVRINIDES J. **2011**. Insects as alternative hosts for phytopathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Review* 35, 555–575.
- NEJAT N, VADAMALAI G, DAVIS RE, HARRISON NA, SIJAM K, DICKINSON M, ABDULLAH SN y ZHAO Y. **2013**. 'Candidatus Phytoplasma malaysianum', a novel taxon associated with virescence and phyllody of Madagascar periwinkle (*Catharanthus roseus*). *International Journal Systematic Evolutionary Microbiology*. 63(Pt 2):540-8.
- NICOLAISEN M., CONTALDO N., MAKAROVA O., PALTRINIERI S., BERTACCINI A. **2011**. Deep amplicon sequencing reveals mixed phytoplasma infection within single grapevine plants. *Bulletin of Insectology* 64 (Supplement): S35-S36.
- OSHIMA K., KAKIZAWA S., ARASHIDA R., ISHII Y., HOSHI A., HAYASHI Y., KAGIWADA S. and NAMBA S. **2007**. Presence of two glycolytic gene clusters in a severe pathogenic line of Candidatus Phytoplasma asteris. *Molecular plant pathology* 8(4), 481–489
- OSHIMA K., KAKIZAWA S., NISHIGAWA H., JUNG H.Y., WEI W., SUZUKI S., ARASHIDA R., NAKATA D., MIYATA S., UGAKI M. AND NAMBA S. **2004**. Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of a plant-pathogenic phytoplasma. *Nature Genetics*. Vol 36, No. 1.
- OXELMAN, B., LIDE´N, M., AND BERGLUND, D. **1997**. Chloroplast *rps16* intron phylogeny of the tribe Sileneae (Caryophyllaceae). *Plant Systematic Evolution*. 206: 393–410.
- PACROS, P., HERNOULD, M., TEYSSIER, E., EVEILLARD, S. y RENAUDIN, J. **2007**. Stolbur phytoplasma-infected tomato showed alteration of SIDEF methylation status and deregulation of methyltransferase gene expression. *Bulletin of Insectology* 60, 221–222.

- PERILLA L. M., GUTIÉRREZ C. G., FILGUEIRA J. J. y FRANCO-LARA L. **2010**. Inoculación experimental de tres especies hospederas de fitoplasmas en Bogotá, Colombia. *Revista Facultad de Ciencias, Universidad Militar Nueva Granada*. Vol 6 No 2, pp 198-213.
- PINZÓN O. P. y PEDREROS L. F. **1995**. Biología y hábitos de la Chinche del Urapán. *Sanidad Forestal*. Vol. 4 No. 9 p. 16-22.
- SARACCO, P. BOSCO, D. VERATTI, F. MARZACHÌ, C. **2006**. Quantification over time of chrysanthemum yellows phytoplasma (16Sr-I) in leaves and roots of the host plant *Chrysanthemum carinatum* (Schousboe) following inoculation with its insect vector. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 67:212- 219.
- SEEMÜLLER E., C. MARCONE, U. LAUER, A. RAGOZZINO AND M. GÖSCHL. **1998**. Current status of molecular classification of the phytoplasmas. *Journal of Plant Pathology* 80 (1), 3-26
- SEEMÜLLER E., SCHNEIDER, B., MAÜRER R. **1994**. Phylogenetic classification of phytopathogenic mollicutes by sequence analysis of 16S ribosomal DNA. *International Journal Systematic Bacteriology* 44,440–446.
- SERUGA M., D. S KORIC, S. BOTTI, S. PALTRINIERI, N. JURETIC y A. F. BERTACCINI. **2003**. Molecular characterization of a phytoplasma from the aster yellows (16SrI) group naturally infecting *Populus nigra* L. Italic trees in Croatia. *Forest Pathology*. 33 113–125
- SIDDIQUE, A. B. M., GUTHRIE, J. N., WALSH, K. B., WHITE, D. T., and SCOTT, P. T. **1998**. Histopathology and within-plant distribution of the phytoplasma associated with Australian papaya dieback. *Plant Disease*. 82:1112-1120.
- SINCLAIR W. A., GRIFFITHS H. M. and DAVIS R. E. **1996**. Ash Yellows and Lilac Witches´-Broom: Phytoplasmal Diseases of Concern in Forestry and Horticulture. *Plant disease*. Vol. 80 No. 5 p. 468-475
- SMART C. D., B. SCHNEIDER, C. L. BLOMQUIST, L. J. GUERRA, N. A. HARRISON, U. AHRENS, K.-H. LORENZ, E. SEEMULLER, and B. C. KIRKPATRICK. **1996**. Phytoplasma-Specific PCR Primers Based on sequences of the 16S-23S rRNA Spacer Region. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 62, No. 8 p. 2988–2993
- STRAUSS E. **2009**. Phytoplasma Research Begins to Bloom. *Science*. Vol 325 pp. 388-390
- SUGIO A. and HOGENHOUT S. A. **2012**. The genome biology of phytoplasma: modulators of plants and insects. *Current Opinion in Microbiology* 15:1–8
- SUGIO A., MACLEAN M., KINGDOM H., GRIEVE V., R. MANIMEKALAI Y S. HOGENHOUT. **2011**. Diverse Targets of Phytoplasma Effectors: From Plant Development to Defense Against Insects. *Annual Review Phytopathology*. 49:175-195

- SUZUKI S., OSHIMA K., KAKIZAWA S., ARASHIDA R., JUNG H.Y., YAMAJI Y., NISHIGAWA H., UGAKI M., NAMBA S. **2006**. Interaction between the membrane protein of a pathogen and insect microfilament complex determines insect-vector specificity. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 103: 4252-4257
- TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, STECHER G, NEI M, AND KUMAR S. **2011**. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.
- TANNE E., BOUDON-PADIEU E., CLAIR D., DAVIDOVICH M., MELAMED S., and KLEIN M. **2001**. Detection of phytoplasma by polymerase chain reaction of insect feeding medium and its use in determining vectoring ability. *Phytopathology* 91:741-746.
- TOMLINSON J. A., BOONHAM N. AND M. DICKINSON. **2010**. Development and evaluation of a one-hour DNA extraction and loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of phytoplasmas. *Plant Pathology* 59, 465–471
- TOVAR C, G. **2007**. Manejo del arbolado urbano en Bogotá. *Territorios* 16-17, 149-173.
- TRAN-NGUYEN L.T.T. and GIBB K.S. **2007**. Optimizing Phytoplasma DNA Purification for Genome Analysis. *Journal of Biomolecular Techniques* 18:104–112
- TRAN-NGUYEN, L.T.T., KUBE, M., SCHNEIDER, B., REINHARDT, R. and GIBB, K.S. **2008**. Comparative genome analysis of 'Ca. P.australiense' (subgroup tuf-Australia I; rp-A) and 'Ca. Phytoplasma asteris' strains OY-M and AY-WB. *Journal of Bacteriology* 190, 3979–3991.
- VARGAS J. M. **2007**. Revisión taxonómica de los cicadelinos del género *Sooosiulus* (Hemiptera, Auchenorrhyncha, Cicadellidae) en Colombia. Tesis (Magíster en Ciencias Agrarias - Énfasis en Entomología). Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Agronomía.
- WALLY O., A. EL HADRAMI, A.H. KHADHAIR, L.R. ADAM, T. SHINNERS-CARNELLEY, B. ELLIOTT and F. DAAY **2008**. DNA sequencing reveals false positives during the detection of aster yellows phytoplasmas in leafhoppers. *Scientia Horticulturae* 116, 130–137
- WANG, K. and HIRUKI, C. **2005**. Distinctions between phytoplasmas at the subgroup level detected by heteroduplex mobility assay. *Plant Pathology* 54, 625–33.
- WEI W., R.E. DAVIS, LEE I.-M. and ZHAO Y. **2007**. Computer-simulated RFLP analysis of 16S rRNA genes: identification of ten new phytoplasma groups. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57, 1855–1867.
- WEINTRAUB P. G. and BEANLAND L. **2006**. Insect Vectors of Phytoplasmas. *Annual Review Entomology*.51:91–111
- WILSON, M. R and WEINTRAUB, P. **2007**. An introduction to Auchenorrhyncha phytoplasma vectors. *Bulletin of Insectology* 60, 177-178.

- WIN NK, LEE SY, BERTACCINI A, NAMBA S. y JUNG HY. **2013**. 'Candidatus Phytoplasma balanitae' associated with witches' broom disease of *Balanites triflora*. *International Journal Systematic Evolutionary Microbiology* 63(Pt 2):636-40.
- ZHAO Y., WEI W., DAVIS R. E., LEE I-M. **2010**. Recent Advances in 16S rRNA Gene-based Phytoplasma differentiation, Classification and Taxonomy. Capítulo 5 Libro, *Phytoplasmas: Genomes, Plant Hosts and Vectors CAB international* (eds P. G. Weintraub and P. Jones) p 75.
- ZHAO Y., WEI W., LEE I-M, SHAO J., SUO X. AND DAVIS R. E. **2009**. Construction of an interactive online phytoplasma classification tool, *rPhyClassifier*, and its application in analysis of the peach X-disease phytoplasma group (16SrIII). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59, 2582–2593.

Sitios WEB

- WALLANDER E. Eva Wallander, Last updated: 2011-05-25.
<http://www.oleaceae.info/fraxinus/uhdei.html>, [Accedido: 20 Junio 2013]
- WILSON M. R. and TURNER, J. A. **2010** *Leafhopper, Planthopper and Psyllid Vectors of Plant Disease*. Amgueddfa Cymru - National Museum Wales. Available online at <http://naturalhistory.museumwales.ac.uk/Vectors>. [Accedido: 1 Julio 2013].

Secuencias obtenidas en árboles

>*Fraxinus* sp (JQ730859)

GAAACGACTGCTAAGACTGGATAGGAGACAAGAAGGCATCTTCTTTTAAAAAGACCTAGCAATAGGTATGCTTAGGGAGGAGCTTGC
 GTCACATTAGTTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGACTATGATGTGTAGCCGGGCTGAGAGGTTGAACGGCCACATTGGGACTGAG
 ACACGGCCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTTCGGCAATGGAGGAAACTCTGACCGAGCAACGCCCGTGAACGATGA
 AGTATTTCCGTTACGTAAGGTTCTTTTATTAGGGAAGAATAAATGATGGAATAAATCATTCTGACGGTACCTAATGAATAAGCCCCGCTAAC
 TATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGGGGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGCGTAAAGGGTGCCTAGGGCGTTAAATAAGTTT
 ATGGTCTAAGTGAATGCTCAACATTGTGATGCTATAAAAAGTGTAGCTAGAGTAAGATAGAGGCAAGTGAATTCCATGTGTAGTGGT
 AAAATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAGTAGCGAAGGCGGCTTCTGGGCTTTACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCA
 AACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTACTAAACGTTGGGTAAACCAGTGTGAAGTTGACACATTAAGTAC
 TCCGCTGAGTAGTACGCAAGTATGAACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTAAATTCGAAGG
 TACCCGAAAAACCTCACCAGGCTTTCACATGCTTCTGCAAAAGCTGTAAGAACACAGTGGAGGTTATCAGTTGCACAGGTGGTGCATGGT
 GTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATTGTTAGTTACCAGCACGTAATGGTGGGGACT
 TTAGCAAGACTGCCAGTGAATTTGGAGGAAGGTGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACAAACGTGATAC
 AATGGCTGTACAAAGGGTAGCTGAAGCGCAAGTTTTGGCGAATCTCAAAAAACAGTCTCAGTTCCGATTGAAGTCTGCAACTCGACT
 TCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAAATCGCAATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTTCCGCGGGTTGTACACACCCGCCGCTCA

>*Populus* sp (JQ730860)

GAAACGACTGCTAAGACTGGATAGGAGACAAGAAGGCATCTTCTTTTAAAAAGACCTAGCAATAGGTATGCTTAGGGAGGAGCTTGC
 GTCACATTAGTTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGACTATGATGTGTAGCCGGGCTGAGAGGTTGAACGGCCACATTGGGACTGAG
 ACACGGCCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTTCGGCAATGGAGGAAACTCTGACCGAGCAACGCCCGTGAACGATGA
 AGTATTTCCGTTACGTAAGGTTCTTTTATTAGGGAAGAATAAATGATGGAATAAATCATTCTGACGGTACCTAATGAATAAGCCCCGCTAAC
 TATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACACAGGGGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGCGTAAAGGGTGCCTAGGGCGTTAAATAAGTTT
 ATGGTCTAAGTGAATGCTCAACATTGTGATGCTATAAAAAGTGTAGCTAGAGTAAGATAGAGGCAAGTGAATTCCATGTGTAGTGGT
 AAAATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAGTAGCGAAGGCGGCTTCTGGGCTTTACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCA
 AACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTACTAAACGTTGGGTAAACCAGTGTGAAGTTAACACATTAAGTAC
 TCCGCTGAGTAGTACGCAAGTATGAACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTAAATTCGAAGG
 TACCCGAAAAACCTCACCAGGCTTTCACATGCTTCTGCAAAAGCTGTAAGAACACAGTGGAGGTTATCAGTTGCACAGGTGGTGCATGGT
 GTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATTGTTAGTTACCAGCACGTAATGGTGGGGACT
 TTAGCAAGACTGCCAGTGAATTTGGAGGAAGGTGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACAAACGTGATAC
 AATGGCTGTACAAAGGGTAGCTGAAGCGCAAGTTTTGGCGAATCTCAAAAAACAGTCTCAGTTCCGATTGAAGTCTGCAACTCGACT
 TCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAAATCGCAATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTTCCGCGGGTTGTACACACCCGCCGCTCA

>*Pittosporum undulatum* (JQ730861)

GAAACGACTGCTAAGACTGGATAGGAGACAAGAAGGCATCTTCTTTTAAAAAGACCTAGCAATAGGTATGCTTAGGGAGGAGCTTGC
 GTCACATTAGTTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGACTATGATGTGTAGCCGGGCTGAGAGGTTGAACGGCCACATTGGGACTGAG
 ACACGGCCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTTCGGCAATGGAGGAAACTCTGACCGAGCAACGCCCGTGAACGATGA
 AGTATTTCCGTTACGTAAGGTTCTTTTATTAGGGAAGAATAAATGATGGAATAAATCATTCTGACGGTACCTAATGAATAAGCCCCGCTAAC
 TATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGGGGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGCGTAAAGGGTGCCTAGGGCGTTAAATAAGTTT
 ATGGTCTAAGTGAATGCTCAACATTGTGATGCTATAAAAAGTGTAGCTAGAGTAAGATAGAGGCAAGTGAATTCCATGTGTAGTGGT
 AAAATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAGTAGCGAAGGCGGCTTCTGGGCTTTACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCA
 AACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTACTAAACGTTGGGTAAACCAGTGTGAAGTTAACACATTAAGTAC
 TCCGCTGAGTAGTACGCAAGTATGAACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTAAATTCGAAGG
 TACCCGAAAAACCTCACCAGGCTTTCACATGCTTCTGCAAAAGCTGTAAGAACACAGTGGAGGTTATCAGTTGCACAGGTGGTGCATGGT
 GTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATTGTTAGTTACCAGCACGTAATGGTGGGGACT
 TTTAGCAAGACTGCCAGTGAATAATTTGGAGGAAGGTGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACAAACGTGATA
 CAATGGCTGTACAAAGGGTAGCTGAAGCGCAAGTTTTGGCGAATCTCAAAAAACAGTCTCAGTTCCGATTGAAGTCTGCAACTCGACT
 TTCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAAATCGCAATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTTCCGCGGGTTGTACACACCCGCCGCTCA

>*Croton* (JQ730858)

GAAACGACTGCTAAGACTGGATAGGAGACAAGAAGGCATCTTCTTTTAAAAAGACCTAGCAATAGGTATGCTTAGGGAGGAGCTTGC
 GTCACATTAGTTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGACTATGATGTGTAGCCGGGCTGAGAGGTTGAACGGCCACATTGGGACTGAG
 ACACGGCCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTTCGGCAACGGAGGAAACTCTGACCGAGCAACGCCCGTGAACGATGA
 AGTATTTCCGTTACGTAAGGTTCTTTTATTAGGGAAGAATAAATGATGGAATAAATCATTCTGACGGTACCTAATGAATAAGCCCCGCTAAC
 TATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGGGGGCAGGCGTTATCTGGAATTATTGGCGTAAAGGGTGCCTAGGGCGTTAAATAAGTTT
 ATGGTCTAAGTGAATGCTCAACATTGTGATGCTATAAAAAGTGTAGCTAGAGTAAGATAGAGGCAAGTGAATTCCATGTGTAGTGGT
 AAAATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAGTAGCGAAGGCGGCTTCTGGGCTTTACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCA
 AACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTACTAAACGTTGGGTAAACCAGTGTGAAGTTAACACATTAAGTACTC
 CGCCTGAGTAGTACGCAAGTATGAACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTAAATTCGAAGGTA
 CCCGAAAAACCTCACCAGGCTTTCACATGCTTCTGCAAAAGCTGTAAGAACACAGTGGAGGTTATCAGTTGCACAGGTGGTGCATGGTGT
 CGTACGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATTGTTAGTTACCAGCACGTAATGGTGGGGACTTT
 AGCAAGACTGCCAGTGAATTTGGAGGAAGGTGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACAAACGTGATACAA
 TGGCTGTACAAAGGGTAGCTGAAGCGCAAGTTTTGGCGAATCTCAAAAAACAGTCTCAGTTCCGATTGAAGTCTGCAACTCGACTTC
 ATGAAGTTGGAATCGCTAGTAAATCGCAATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTTCCGCGGGTTGTACACACCCGCCGCTCA

>*Croton* ADN33 (L38-LMP5) HG764348

AATAGTGGAAAACTATCTTGACGTTATTCAATGAATAAGCCCCGGCTAATATGTCCAGCAGCCGCGGTAAGACATAGGGGGCGAGC
 GTTATCCGGAAATTTGGGCGTAAAGGGTGCCTAGCGGTTAGGAAAGCTATAATTTAATTTCAAGTCTTAAACGCTGTCTTGTATAGAA
 ACTACCTTGACTAGAGTTAGATAGAGCAAGCGGAATCCATGATGTAAGCTGAAATGTGTAATATATGGAGGAACACCAGGCGTAG
 GCGGCTTGGTGGTCTTACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGTAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCG
 ATGAGTACTAAGTGTCCGGATAAAAACCTCGTACTGAAGTTAACACATTAAGTACTCCGCTGAGTAGTACGTAACGTAAGTAA
 AGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTAAATTCGAAGATACACGAAAACTTACCAGGCTTGCATGCTCTGC
 AAG

GGTGGGGACTTTAGCAAGACTGCCAGTGATGAATTGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACA
AACGTGATACAATGGCTGTACAG

>Populus ADN37 (LMP6) HG764355

GAAAACTATCTTGACGTTATTC AATGAATGAAGCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACATAGGGGGCGAGCGTTATACC
GGAATTTGGGCGTAAAGGGTGCCTAGGCGGTTAGGAAAGTCTATAATTTAATTTTCAGTGTAAACGCTGTCTTGTATAGAACTACCT
TGACTAGAGTTAGATAGAGGCAAGCGGAATTCATGTGTAGCGGTAATAATGTGTAATAATATGGAGGAACACCAGAAAGCGTAGGCGGCT
TGCTGGGCTTTGACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGAGTA
CTAAGTGTGGGATAAACTCGGTACTGAAGTTAACACATTAAGTACTCCGCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAACTTAAAGGAATT
GACGGGACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTAATTCGAAGATACACGAAAAATCTTACCAGGCTTGGACATGCTCTGCAAAAG

Secuencias obtenidas en Insectos Cicadélidos

>MF01 i20 (contig RM38) HG764356

GATAGCCCCGCTACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACATAGGGGGCGAGCGTTATCCGGAATTTGGGCGTAAAGGGTGCCTAGG
CGGTTAGGAAAGTCTATAATTTAATTTTCAGTGTAAACGCTGTCTTGTATAGAACTACCTTGACTAGAGTTAGATAGAGGCAAGCGGAA
TTCCATGTGTAGCGGTAATAATGTGTAATAATATGGAGGAACACCAGAAGCGTAGGCGGCTTGTCTGGTCTTACTGACGCTGAGGCACG
AAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGAGTACTAAGTGTGGGATAAACTCGGTACTGA
AGTTAACACATTAAGTACTCCGCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCGGTGGATCA
TGTTGTTAATTCGAAGATACACGAAAAATCTTACCAGGCTTGGACATGCTCTGCAAAAGTTATAGAAA

>MF01 i20 (Contig L56.1) HG764357

CGGCAATGGGAGAACTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGTATTTCCGGTACGTAAAGTTCTTTTATTAGGGAAGAATAAATG
AGCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATGAATAAGCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGGGGGCAAGCGTTA
TCCGGAATTTGGGCGTAAAGGGTGCCTAGGCGGTTAATAAGTTTATGGTCTAAGTGCATGCTCAACATTGTGATGCTATAAAAACT
GTTTAGCTAGAGTAAGATAGAGGCAAGTGAATTCATGTGTAGTGGTAAAAATGCGTAAATAATGGAGGAACACCAGTAGCGAAGCGG
GCTTGTGGGCTTTACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGAGTA
GTACTAAACGTTGGGTAACCAGTGTGAAGTTAACACATTAAGTACTCCGCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAACTTAAAGGAAT
TGACGGGACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTAATTCGAAGTACCCGAAAAACCTCACCAGGCTTGGACATGCTCTGCAAAAGC
TGTAGAAACACAGTGGAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTTAAGTGGTGTGCTGAGTACTAAGTGGTGGGTTAAGTCCCGCAA
CGAGCGCAACCTTATTGTTAGTTACCAGCACGTAATGGTGGGACTTTAGCAAGACTGCCAGTATGAACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTT
ACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACAAACGTGATACAATGGCTGTTACAAAGAGTAGCTGAA

>MF02 i1 (Contig L57.1) HG764358

GCCTGAACGATGAAGTATTTCCGGTACGTAAAGTTCTTTTATTAGGGAAGAATAAATGATGGAAAAATCATTCTGACGGTACCTAATGAATA
AGCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGGGGGCAAGCGTTATCCGGAATTTGGGCGTAAAGGGTGCCTAGGCG
GGTAAATAAGTTTATGGTCTAAGTGAATGCTCAACATTGTGATGCTATAAAAACTGTTTAGCTAGAGTAAGATAGAGGCAAGTGGAAAT
CCATGCGTAGTGGTAAAAATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAGTAGCGAAGGCGGCTTGTCTGGGCTTTACTGACGCTGAGGCACGAA
AGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGAGTACTAAGCTTTGGGTAACCAAGTGTGAAAGTT
AACACATTAAGTACTCCGCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTT
GTTAATTCGAAGGTACCCGAAAAACCTCACCAGGCTTGGACATGCTCTGCAAAAGCTGTAGAAACACAGTGGAGGTTATCAGTTGCACA
GGTGGTGCATGGTTGCTGCTGAGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTATTGTTAGTTACCAGCACG
TAATGGTGGGACTTTAGCAAGACTGCCAGTATGAACTTGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGG
TACAAACGTGATACAATGGCTGTTACA

>MF03 i5 (Contig L58.1) HG764359

GCCTGAACGATGAAGTATTTCCGGTACGTAAAGTTCTTTTATTAGGGAAGAATAAATGATGGAAAAATCATTCTGACGGTACCTAATGAATA
AGCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGGGGGCAAGCGTTATCCGGAATTTGGGCGTAAAGGGTGCCTAGGCG
GGTAAATAAGTTTATGGTCTAAGTGAATGCTCAACATTGTGATGCTATAAAAACTGTTTAGCTAGAGTAAGATAGAGGCAAGTGGAAAT
CCATGCGTAGTGGTAAAAATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAGTAGCGAAGGCGGCTTGTCTGGGCTTTACTGACGCTGAGGCACGAA
AGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGAGTACTAAGCTTTGGGTAACCAAGTGTGAAAGTT
AACACATTAAGTACTCCGCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTT
GTTAATTCGAAGGTACCCGAAAAACCTCACCAGGCTTGGACATGCTCTGCAAAAGCTGTAGAAACACAGTGGAGGTTATCAGTTGCACA
GGTGGTGCATGGTTGCTGCTGAGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTATTGTTAGTTACCAGCACG
TAATGGTGGGACTTTAGCAAGACTGCCAGTATGAACTTGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGG
TACAAACGTGATACAATGGCTGTTACA

>MF03 i5 (RM40 Seg) HG764360

CCGACGCCGCTAGACATAGGGGGCGAGCGTTATCCGGAATTTGGGTAAGGAGGTTAGGCGGTTAGGAAAGTCTATAATTTAA
TTTCAATGCTTAACGCTGTCTTGTATAAAAACTACCTTGACTAGATTAGATAGAGGCAAGCGGAATTCATGTGTAGCGGTAAAATGTG
TAAATATATGGAGAACACCAGGAGCGTAGGCGGCTTGTGGGCTTGTAGCTGAGGCGTGGGAGCAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGAGTACTAAGTGTGGGATAAACTCGGTACTGAAGTTAACACATTAAGTACTCCGCC
TGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTAATTCGAAGATACACG
AAAAATCTTACCAGGCTTGGACATGCTGCAAAAGTTATAGAAA

>MF04 i15 (Contig T9) HG764361

CGGCAAAAGGGAGAACTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGTATTTCCGGTACGTAAAGTTCTTTTATTAGGGAAGAATAAATG
TGAAAAATCATTCTGACGGTACCTAATGAATAAGCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGGGGGCAAGCGTTAT
CCGGAATTTGGGCGTAAAGGGTGCCTAGGCGGTTAATAAGTTTATGGTCTAAGTGAATGCTCAACATTGTGATGCTATAAAAACTG
TTTAGCTAGAGTAAGATAGAGGCAAGTGAATTCATGTGTAGTGGTAAAAATGCGTAAATAATGGAGGAACACCAGTAGCGAAGCGG
CTTGTGGGCTTTACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGAG
TACTAAACGTTGGGTAACCAGTGTGAAGTTAACACATTAAGTACTCCGCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAACTTAAAGGAATT
GACGGGACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTAATTCGAAGTACCCGAAAAACCTCACCAGGCTTGGACATGCTCTGCAAAAGCT
GTAGAAACACAGTGGAGGTTATCAGTTGCACAGGTTGGTGCATGGTTGCTGCTGAGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAAC

GAGCGCAACCCCTTATTGTTAGTTACCAGCACGTAATGGTGGGGACTTTAGCAAGACTGCCAGTGATGAATTGGAGGAAGGTGGGGACGA
CGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACAAACGCTGATACAATGGCTGTTACAAAGAGTAGTTGAA

>MF04 i12 (L60.2) HG764362

CTCGAAGGAGGAAACTCAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTTAATTCGAAGGTACCCGAAAAACCTCA
CCAGGTCTTGACATGCTTCTGCAAAGCTGTAGAAACACAGTGGAGGTTATCAGTTGCACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTACGCTCGTGT
CGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATTGTTAGTTACCAGCACGTAATGGTGGGGACTTTAGCAAGACTGCCA
GTGATGAATTGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGCTACAA

>MF04 (contig L62-2) HG764363

GCAATGAGGAACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTTAATTCGAAGGTACCCGAAAAACCTCACCA
GGCTTTGACATGCTTCTGCAAAGCTGTAGAAACACAGTGGAGGTTATCAGTTGCACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTACGCTCGTGTCTGT
GAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATTGTTAGTTACCAGCACGTAATGGTGGGGACTTTAGCAAGACTGCCAGTG
ATGAATTGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACAAACGTCACCTTACAATGGCTGTTACAAA
GAGTAGCTGAAA

>MF04 (contig S8-S10-S11) HG764364

GTTGATTTGACGGGCGGTGTGTACAAACCCGAGAACGTAATCCAGCGACATGCTGATTGCGGATTACTAGCGATTCCAACCTTCATGA
AGTTCGAGTTGCAGACTTCAATCCGAACTGAGACTGTTTTTTTGGATTTCGCCAAAAACTTGCCTTACGCTACCCCTTTGTAACAGCCATTG
TATCACGTTTGTAGCCAGGTCATAAGGGCATGATGATTTGACGTCGTCGCCACCTTCTCCTCAATTCATCACTGGCAGTCTTGCTAAAG
TCCCACACATTACGTCGTTAACTAACAATAAGGGTTGCGCTCGTTCGGGACTTAACCAACATCTCACGACAGAGCTGACGACAA
CCATGCACCACCTGTGCAACTGATAACCTCCACTGTGTTTCTACAGCTTTGCAAGAAGCATGTCAAGACCTGGTGAAGTTTTTCGGGTACC
TTCAATTAACAACATGATCCACCGCTTGTGCGGAGTCCGTAATTCCTTAAAGTTTCATACTGCGTACGTACTACTCAGGCGGAGTA
CTTAATGTGTGAACCTTCAACACTGGTTTTACCCAACGTTTTAGTACTCTGCTGTACGCGCTGGACTGCCAGGGTATCTAATCCTGTTTGT
CCCACGCTTTCGTGCTCAGCGTAGTAAAGACCCAGCAAGCCGCTTCGCTACGTTGTTCTCCTCATATATACACAGCTACCACT
ACACATGAAATCCACTGGCCACTATCTTACTCTAGCTAAACAGTTTTAATAGCATCACAAATGCTGAGCATTGCACCTAGACCATAAACTTA
TTTAAACCGCTACGCAACCTTTACGCCCAATAATCCGGATAACGCTTCCCCCTATGTATTACCGGGCGCTGCTGGCACATAGTTAGCC
GGGGCTTATTCATTAGGTACCGTCAGAATGATTTTTCCATCATTTTCTTCCCTAATAAAAAGAACTTACGTAACGAAATACTTTCATCGT
CACGCGCGCTGCTCGGTGAGGTTTCTCCTATGCCGAAATTCCTACTGCTGCTCCTCCGTTAGGAGTTTGGGCGGTGCTCAGTCCC
AATGTGGCCGTTCAACCTCTCAGCCCGGCTACACATCATGCTTTGGTGGGCTTTACCCCAACCACTAATAATGTGACGCAAGCTCCT
CCCTAAGCATACCTATTGCTAGGCTTTTTAAAAACAAGAAGATGCCTTCTGCTCCTATCCAGTCTTAGCAGTCTGTTCA

>MF04 i13 (Contig L61.1) HG764365

CGGCAATGGGAGAACTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGTATTTCCGGTACGTAAAGTCTTTTTATTAGGGAAGATAAATG
ATGGAAAAATCATTCTGACGGTACCTAATGAATAAGCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGGGGGGCAAGCGTTA
TCCGGAATTTATGGGCGTAAAGGGTGCCTAGGCGGTTAAATAAGTTTTATGGTCTAAGTGAATGCTCAACATTGTGATGCTATAAAAACT
GTTTAGCTAGAGTAAGTAGAGGCAAGTGAATTCATGTGTAGTGGTAAAATCGCTAATATATGGAGGAACACCAAGTACGGAAGCGG
GCTTGTCTGGGCTTTACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACAGATGA
GTACTAAACGTTGGGTAACCACTGTTGAAGTTAACACATTAAGTACTCCGCTGAGTAGTAGTACGTACGCAACCAAGTGAATGAATGAAT
TGACGGGACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTTAATTCGAAGGTACCCGAAAAACCTCACCAAGTCTTGACATGCTTCTGCAAAGC
GTAGAAACACAGTGGAGGTTATCAGTTGCACAGGTGGTGCATGGTTGCTGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAA
CGAGCGCAACCCCTTATTGTTAGTTACCAGCACGTAATGGTGGGGACTTTAGCAAGACTGCCAGTGAATGGAGGAAGGTGGGGACG
ACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACAAACGTCATACAATGGCTGTTACAAAGAGTAGCTGAA

>MF04 i12 (Contig S7) HG764366

GATTGAAACGACTGCTAAGACTGGATAGGAGACAAGAAGGCATCTTCTGTTTTTAAAGACCTAGCAATAGGTATGCTTAGGGAGGAGC
TTGGCTACATTAGTTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGACTATGATGTGTAGCCGGGCTGAGAGGTTGAACGGCCACATTTGGGAC
TGAGACACGGCCCAAACCTACCGGAGGCAGCAGTAGGGAAATTTCCGGCAATGGAGGAAACTCTGACCCAGCAACGCCGCGTGAACG
ATGAAGTATTTCCGTACGTAAGTTCCTTTTATTAGGGAAGATAAATGATGGAAAAATCATTCTGACGGTACCTAATGAATAAGCCCGGC
TAATATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGGGGGCAAGCGTTATCCGGAATTTATGGGCTAAAGGATGCTGAGGCGTTAAATAA
GTTTTAGGCTAAGTGCATGCTCAACATTTGATGCTATATAAAAACTGTTTAGCTAGAGTTAGATAGAGGAGGGAATTTCCATGTGTAG
TGGTAAAATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAAGTACGGAAGGCGGCTTGTGGGCTTTACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGG
AGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGAGTACTAAACGTTGGGTAACCAAGTGTGAAGTTAACACATTA
GTACTCCGCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTTAAAGGAATGACGGGACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTTAATTCG
AAGGTACCCGAAAAACCTCACCAAGTCTTGACATGCTTCTGCAAAGCTGTAGAAACACAGTGGAGGTTATCAGTTGCACAGGTGGTGCAT
GGTTGTCGTGAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATTGTTAGTTACCAGCACGTAATGGTGGG
GACTTTAGCAAGACTGCCAGTGAATTTGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACAAACGCTG
ATACAATGGCTGTTACAAGGGTAGCTGAAGCGCAAGTTTTTGGCGAATCTCAAAAAACAGTCTCAGTTCCGATTGAAGTCTGCAACTC
GACTTCAATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATACGATGTCGCGGTGAATACGTTCCGCGGGTTTTGACACACCGCCCGTCAAAT
CGAATTTCCGCGGCCCATGCGCGCCGGAG

>MF04 i15 (Contig T9) HG764367

ATTCAGTAGTATTGAACGACTGCTAAGACTGGATAGGAGACAAGAAGGCATCTTCTGTTTTTAAAGACCTAGCAATAGGTATGCTTA
GGGAGGAGCTTGCCTCACATTAGTTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGACTATGATGTGTAGCCGGGCTGAGAGGTTGAACGGCC
ACATTTGGACTGAGACAGCCCAAACCTACCGGAGGCAGCAGTAGGGAAATTTCCGGCAATGGAGGAAACTCTGACCCAGCAACGCG
CGCTCCGCTGAGTAGTAAAGTATTTCCGGTACGTAAAGTCTTTTATTAGGGAAGATAAATGATGGAAAAATCACTGACGGTACCTAATGAAT
AAGCCCGGCTAATATGTCACGACGCGCGGTAATACATAGGGGGCAAGCGTTATCCGGAATTTATGGGCGTAAAGGGTGGTGGTGG
CGGTTAAATAAGTTTTATGGTCTAAGTGCATGCTCAACATTTGATGCTATAAAAACTGTTTAGCTAGATGAAGTGAAGGCAAGTGGATT
CATGTAGTGGTAAAGTGCATAATATATGGAGGAACACCAAGTACGTAAGGAAATGACGGGACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTAATTCG
CGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGCTAAACGATGAGTACTAAACGTTGGGTAACCAAGTGTGAAGTTAA
CATTAAAGTACTCCGCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAACTTAAAGGAATGACGGGACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTT
TTAATTCGAAGTACCCGAAAAACCTCACCAAGTCTTGACATGCTTCTGCAAAGCTGTAGAAACACAGTGGAGGTTATCAGTTGCACAGG
TGTTGATGTTGGTGTGCTGAGCTGCTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATTGTTAGTTACCAGCACGTA
TGGTGGGGACTTTAGCAAGACTGCCAGTGAATTTGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTAC
AAAGTGATACAATGGCTGTTACAAGGGTAGCTGAAGCGCAAGTTTTTGGCGAATCTCAAAAAACAGTCTCAGTTCCGATTGAAGTCT

GCAACTCGACTTCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAAATCGCGAATCAGCATGTCCGGTGAATACGTTCTCGGGGTTGTACACACCGCCC
GTCAAATCGAATTCGGCGCCATGCGCGCCGGGAGCATGCGACGTCGGGCCCTCA

>MF04_i18_(P7) HG764368

CGGATTCGCGACGATGAGTATTTCCGGTACGTAAAGTTCTTTTATTAGGGAAGAATAAATGATGGAAAAATCATTCTGACGGTACCTAATGA
ATAAGCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGGGGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCCTA
GGCGGTTAAATAAGTTTATGGTCTAAGTGCAATGCTCAACATTGTGATGCTATAAAAACTGTTTAGCTAGAGTAAGATAGAGGCAAGTGGA
ATTCCATGTGTAGTGGTAAAATGCGTAAAATTTGGAAGAACCACCATTACCAAAGGCGGTTGGTTGGGCTTTTCCGGACCTTAAAGGCCA
AAGCCTGGGGAACCAACCGAATAAAATCCCGGGAATCCCCCCTAAACCAATAATACCAAACTTTGGGAAAAACCGTTGTTAAATT
TACCCCTTTAATTCGCCCGCGGTTAGACCTTCCCAATAAGAAACCTAAAGGAAATTGACCGGACTTCGCACCAACCGGGGGAATAAGGT
GGTTTATTTCAAAGGTCGCCAAAACCTTACCAGTCTTGACACCTTGTTCTGCAAGCTTGAAAAAACCAAGTGGGAGTTATACGTTGCACCG
GGTGGGCATGTTGTCGTCAGCTTCTTTCGTGGAATGTTGGGTAAGTCCCGCAACGAGCCACCTTATTGTTAGTAAACGACGATG
GTGGGGACTTTAGCAAGACTGCAGTGAATAATGGAAGAAGTGGGGACGACGTCATCATGCCCCTTATGACTGGGCTAACACGT
GATACAATGGCTGTACAAGTATACTAAAA

>MF04_i18_(P8) HG764369

GTGACCTCGCGACGATGAGTATTTCCGGTACGTAAAGTTCTTTTATTAGGGAAGAATAAATGATGGAAAAATCATTCTGACGGTACCTAATG
AATAAGCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGGGGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCCTA
GGCGGTTAAATAAGTTTATGGTCTAAGTGCAATGCTCAACATTGTGATGCTATAAAAACTGTTTAGCTAGAGTAAGATAGAGGCAAGTGGA
ATTCCATGTGTAGTGGTAAAATGCGTAAAATATATGGAGGAACACCAGTAGCGAAAGGCGGCTTGCTGGGTCTTTACTGACGCTGAGGCAC
GAAAGCGTGGGAGCAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGGTAACGATGAGTACTAAACGTTGGGTAACCAAGTGTGAA
GTTAACACATTAAGTACTCCGCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCGGTGGATCAT
GTTGTTTAAATCGAAGGTACCCGAAAAACCTACCAGTCTTGACATGCTTCTGCAAGCTGTAGAACACAGTGGAGGTTATCAGTTGC
ACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTATTGTTAGTTACCAGC
ACGTAATGGTGGGGACTTTAGCAAGACTGCCAGTGAATTTGGAGGAAGTGGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCT
GGGCTACAACGTTGATACAATGGCTGTAAAGAAAAAATTAATAAAAAA

>MF04_i21_(P3) HG764370

GGGACTTCGTGACGATGAGTATTTCCGGTACGTAAAGTTCTTTTATTAGGGAAGAATAAATGATGGAAAAATCATTCTGACGGTACCTAATG
AATAAGCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGGGGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCCTA
GGCGGTTAAATAAGTTTATGGTCTAAGTGCAATGCTCAACATTGTGATGCTATAAAAACTGTTTAGCTAGAGTAAGATAGAGGCAAGTGGA
ATTCCATGTGTAGTGGTAAAATGCGTAAAATATATGGAGGAACACCAGTAGCGAAAGGCGGCTTGCTGGGTCTTTACTGACGCTGAGGCAC
GAAAGCGTGGGAGCAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGGTAACGATGAGTACTAAACGTTGGGTAACCAAGTGTGAA
GTTAACACATTAAGTACTCCGCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCGGTGGATCAT
GTTGTTTAAATCGAAGGTACCCGAAAAACCTACCAGTCTTGACATGCTTCTGCAAGCTGTAGAACACAGTGGAGGTTATCAGTTGC
ACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTATTGTTAGTTACCAGC
ACGTAATGGTGGGGACTTTAGCAAGACTGCCAGTGAATTTGGAGGAAGTGGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCT
GGGCTACAACGTTGATACAATGGCTGTACGAAAAAATTAATAAAAAA

>MF04_i38_(Contig L104 - RM50) HG764371

GGCATCTTTTATTGTTAAGACCTTTTTCGGAAGGTATGCTCTAAAGATGAGCTTGCGCCACATTAGTTTGGGGGGGGTAAATGGCCTAC
CAAGACGATGATGTGAGCTGGATTGAGAGGTGCAACAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTA
GGGAATTTTCGGCAATGGAGGAACTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAATTTTCGGTATGTAAGTTCTTTTATTGAAGAA
GAAAAAATAGTGAAAAACTATCTTGACGTTATTCATGAATAAGCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGTAAAGCATAGGGGGC
GAGCGTTATCCGGAAATTTGGGCGTAAAGGGTGCCTAGGGCGTTAGGAAAGTCTATAAATTTAATTCAGTGCCTAACCGCTGCTTTGTTAT
AGAACTACCTTGACTAGAGTTAGATAGAGGCAAGCGGAATTCATGTGTAGCGGTAATAATGTTAAATATGTGGAGGAACACCAGAAAGC
GTAGGCGGCTTGCTGGTCTTGACTGACGCTGAGGCAGAAAGCGTGGTAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGGTA
AACGATGAGTACTAAGTGTCCGGATAAACTCGGTACTGAAAGTAAAGTAAAGTACTCCGCTGAGTAGTACGCAAGGATGATAAGAA
CTTAAAGGAAATGACGGGACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTAATTCGAAGATACACGAAAAATCTTACCAGGTCTTGACATGC
TCTGCAAAGTTATAGTAA

>MF04_Pool3_(Contig RM41) HG764372

AATAAGCCCCGGCTACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACATAGGGGGCAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCCTAG
GCGGTTAGGAAAGTCTATAATTTTCACTGCTTAAACGCTGCTTGTATTAGAAACTACCTTGACTAGAGTTAGATAGAGGCAAGCGGA
ATTCCATGTGTAGCGGTAATGTTGTAATATATGGAGGAACACCAGAAGCGTAGGCGGCTTGCTGGGTCTTGACTGACGCTGAGGCAC
GAAAGCGTGGGTAGCAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGGTAACGATGAGTACTAAGTGTCCGGATAAACTCGGTACTG
AAGTTAACACATTAAGTACTCCGCTGAGTAGTACGTACGCAAGTAAAGGAAATTGACGGGACTCCGCACAAGCGGTGGATG
ATGTTGTTAATTCGAAGATACACGAAAAATCTTACCAGGTCTTGACATGCTCTGCAAAGCTATAGGAAA

>MF05_(Contig L65-2) HG764373

TTTCTTTCAGTACCTTTTGTAAACAGCCATTGTATCACGTTTGTAGCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCGTCACCTTC
CTCCAATTCATCACTGGCAGTCTTGCTAAAGTCCCACTTACGTCGTTGTAACATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAAC
CCAACTCTCACGACACGAGCTGACGACAACCTGACCACTGTCGCAACTGATAACCTCCACTGTGTTTTCTACAGCTTTGCAGAAGCAT
GTCAAGACCTGGTGAAGTTTTTCGGGTACCTTCAATTAACAACATGATCCACCGCTTGTCGGGAGTCCCGTCAATTCCTTTAAGTTCT
CCATTGC

>MF05_i9_(P5) HG764374

GTTGCTGCGTGACGATGAGTATTTCCGGTACGTAAAGTTCTTTTATTAGGGAAGAATAAATGATGGAAAAATCATTCTGACGGTACCTAATG
AATAAGCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGGGGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCCTA
GGCGGTTAAATAAGTTTATGGTCTAAGTGCAATGCTCAACATTGTGATGCTATAAAAACTGTTTAGCTAGAGTAAGATAGAGGCAAGTGGA
ATTCCATGTGTAGTGGTAAAATGCGTAAAATATATGGAGGAACACCAGTAGCGAAAGGCGGCTTGCTGGGTCTTTACTGACGCTGAGGCAC
GAAAGCGTGGGAGCAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGGTAACGATGAGTACTAAACGTTGGGTAACCAAGTGTGAA
GTTAACACATTAAGTACTCCGCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCGGTGGATCAT
GTTGTTTAAATTCGAAGGTACCCGAAAAACCTACCAGTCTTGACATGCTTCTGCAAGCTGTAGAACACAGTGGAGGTTATCAGTTGC
ACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTATTGTTAGTTACCAGC
ACGTAATGGTGGGGACTTTAGCAAGACTGCCAGTGAATTTGGAGGAAGTGGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCT
GGGCTACAACGTTGATACAATGGCTGTACAG

>MF05 i11(Contig L66.1) HG764375

GCGTGAACGATGAAGTATTTCCGGTACGTAAGTCTTTTTATTAGGGAAGAATAAATGATGGAAAAATCATTCTGACGGTACCTAATGAATA
AGCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGGGGGCAAGCGTTATCCGGAATTTATGGCGTAAAGGGTGGCTAGGC
GGTTAAATAAGTTTATGGTCTAAGTCAATGCTCAACATTGTGATGCTATAAAAACTGTTTAGCTAGAGTAAAGATAGAGGCAAGTGGAAAT
CCATGTGTAGTGGTAAAAATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAGTAGCGAAGGCGCGCTTGCTGGGCTTTACTGACGCTGAGGCACGAA
AGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGAGTACTAAACGTTGGGTAACCAAGTGTGAAGTT
AACACATTAAGTACTCCCGCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTT
GTTTAATTCCGAAGTACCCGAAAAACCTCACCAAGGCTTGGACATGCTTCTGCAAAAGCTGTAGAAACACAGTGGAGGTTATCAGTTGCACA
GGTGGTGCATGGTTGTCGTAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTACCAGCAGC
TAATGGTGGGACTGTTTAGCAAGACTGCCAGTGAATGGAGGAAAGTGGAGGACGTCAAAATCATGCCCCCTTATGACCTGGCCTG
TACAACGTGATACAATGGCTGTTACA

>MF05 i37 (L103) HG764376

CTGGGCTTTGCATCTTCTTGTTTTTAAGACCTAGCAATAGGTATGCTTAGGGAGGAGCTTGCGTCACATTAGTTAGTTGGTGGGTAAG
GCCTACCAAGACTATGATGTGTAGCCGGCTGAGAGGTTGAACGGCCACATTTGGACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCA
GCAGTATGGGAATTTCCGCAATGGAGGAACTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGTATTTCCGGTACGTAAGGTTCTTTTATT
AGGGAAGAATAAATGATGGAAAAATCATTCTGACGGTACCTAATGAATAAGCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATA
GGGGCAAGCGTTATCCGGAATTTATGGGCGTAAAGGGTGGTAGGCGGTTAAATAAGTTTATGGTCTAAGTGAATGCTCAACATTGT
GATGCTATAAAAACTGTTTAGCAAGACTGCCAGTGAATGGAGGAAAGTGGAAATTCATGTGTAGTGGTAAAAATGCGTGAATATATGGAGGAACAC
CATTGGCAGGCTTTTTGCTGGGCTTGGACGACTTGGACGCCGAAAGCGTTTTCCCC

>MF05 Pool4 (RM42 Seg) HG764377

GAATAGCCCGGCTACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACATAGGGGGCAGCGTTATCCGGAATTTATGGGCGTAAAGGGTGGCTA
GGCGGTTAGGAAAGCTATAATTTAATTTCAAGTGTAAACGCTGCTTGTATAGAAACTACCTTGACTAGAGTTAGATAGAGGCAAGCGG
AATTCATGTGTAGCGGTAATAATGTGTAATAATATGGAGGAACACCAGAAGCGTAGGCGGCTTGCTGGGCTTTGACTGACGCTGAGGCA
CGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGAGTACTAAGTGTCCGGATAAACTCGGTACT
GAAGTTAACACATTAAGTACTCCGCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCGGTGGAT
CATGTTGTTAATTCGAAGATACACGAAAAATCTTACAGGCTTTCACGCTGTGACATTGCTCTGCAAAAGTTATAGAAA

>MF06 (Contig L59.1) HG764378

CGGCAATGGGAGAACTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGTATTTCCGGTACGTAAGTCTTTTTATTAGGGAAGAATAAATG
ATGGAAAAATCATTCTGACGGTACCTAATGAATAAGCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGGGGGCAAGCGTTA
TCCGGAATTTATGGGCGTAAAGGGTGGTAGGCGGTTAAATAGTTTATGGTCTAAGTGAATGCTCAACATTGTGATGCTATAAAAGCT
GTTTAGCTAGAGTAAGATAGAGGCAAGTGAATTCATGTGTAGTGTAAAAATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAGTAGCGAAGCGG
GCTTGTCTGGTCTTTACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGA
GACTAAACGTTGGGTAACCAAGTGTGAAGTTAACACATTAAAGTACTCCGCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAACTTAAAGGAAT
TGACGGGACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTAATTCGAAGGTAACCCGAAAAACCTCACCAAGGCTTTGACATGCTTCTGCAAAAGC
GTAGAAACACAGTGGAGGTTATCAGTTGCACAGTGGTGCATGTTGTCGTGAGTGTGCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCGCAA
CGAGCGCAACCCCTATTGTTAGTTACCAGCAGTAAATGGTGGGACTTTAGCAAGACTGCCAGTGAATTTGGAGGAAGGTGGGGACG
ACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACAACGCTGATACAATGGCTGTTACAAGAGTAGTGAA

>MF06 i35 (Contig M1-L90-L98) HG764379

TAGTGGCGACGGGTGAGTACGCGTAAGCAATCTGCCCTAAGACGAGGATAACAGTTGGAACGACCCGCTAAGACTGGATAGGAGACA
AGAAGGCATCTTCTTGTTTTTAAAAGACCTAGCAATAGGTATGCTTAGGGAGGAGCTTCCGTCACATTAGTTAGTTGGTGGGTAAGGC
CTACCAAGACTATGATGTGTAGCCGGCTGAGAGGTTGAACGGCCACATTTGGACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCGAAT
AGTAGGGAATTTCCGCAATGGAGGAACTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGTATTTCCGGTACGTAAGTCTTTTATTAG
GGAAGAATAAATGATGGAAAAATCATTCTGACGGTACCTAATGAATAAGCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGG
GGGCAAGCGTTATCCGGAATTTATGGGCGTAAAGGGTGGTAGGCGGTTAAATAGTTTATGGTCTAAGTGAATGCTCAACATTGTGAT
GCTATAAAACTGTTTAGCTAGAGTAAGATAGAGGCAAGTGGAAATCCATGTGTAGTGGTAAAAATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAG
TAGCGAAGGCGGCTTGTGGGCTTTACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGC
CGTAAACGATGAGTACTAAACGTTGGGTAACCAAGTGTGAAGTTAACACATTAAGTACTCCGCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGA
AAGTTAAAGGAATTTAGCTAGAGTAAAGTACGAGGCAAGTGGATCATGTTGTTAATTCGAAGGTAACCCGAAAAACCTCACCAAGGCTTTGACAT
GCTCCTGCAAGCTGTAGAAACACAGTGGAGGTTATCAGTTGCACAGTGGTGCATGTTGTCGTGAGTGTGCGTGTGAGATGTTGGG
TTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATTGTTAGTTACCAGCAGTAAATGGGGGGACTTTACCAAGACTGCCAGTGAATTTGGAA
GAAAGGTGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACAACGCTGA

>MF06 i39 (Contig RM48- RM51) HG764380

AAGCCGGCAATACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACATAGGGGGCAGCGTTATCCGGAATTTATGGTGTAAAGGGTGGCTAGGC
GGTTAGGAAAGTCTATAATTTAATTTCTGTGCTTAAACGCTGCTTGTATAGAAACTACCTTGACTAGAGTTAGATAGAGGCAAGCGGAAAT
TCCATGTGTACCGTAAATGTGTAATAATATGGAGGAACACCAGAAGCGTAGGCGGCTTGGTGGGCTTGGACTGACGCTGAGGCACGA
AAGCGTGGGTAGCAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGAGTACTAAGTGTCCGGATAAACTCGGTACTGAA
GTTAACACATTAAGTACTCCGCTGAGTAGTACGTACCAAGTATGAAACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCGGTGGATCAT
GTTGTTAATTCGAAGATACACGAAAAATCTTACCAGGCTTGGACATGCTCTGCAAAAGTTATA

>MF06 Pool5 (Contig RM43- L97) HG764381

GGCATCTTTTTATTTTAAAGACCTTTTTGAGAAAGGTATGCTTAAAGATGAGCTTGCCACATTAGTTTGTGGTGGGTAATGGCCTAC
CAAGACGATGATGTGTAGCTGGACTGAGAGGTGCAACAGCCACATTTGGACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTA
GGGAATTTCCGCAATGGAGGAACTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGTATTTCCGGTATGTAAGGTTCTTTTATTGAAGAA
GAAAAAATAGTGGAAAACTATCTTGAAGTTATTCATGAATAACGCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACATAGGGGGC
GAGCGTTATCCGGAATTTATGGCTGGGGTGGTAGGCGGTTAGGAAAGTCTATAATTTAATTTCAAGTGTCTTAAACGCTGTCTTGTATAGAA
ACTACCTTGACTAGAGTTAGATAGAGGCAAGCGGAAATCCATGTGACCGGTAATAATGTTAAATATATGGAGGAACACCAGAAGCGGTAG
CGGCTTGGTCTGGTCTGACTGAGGTCAGGCACGAAAGCGTGGTGAACCAAGGATTAGATACCCTGGTACCCAGCCGCTAAACG
ATGACTACTAAGTGTCCGGATAAACTCGGTACTGAAAGTTAACACATTAAGTACTCCGCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTTAA
AGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTAATTCGAAGATACACGAAAAATCTTACCAGGCTTGGACATGCTCTGC
AAAGTTATAGAAA

>MF07 i40(RM45 Seg) HG764382

TGAATAGCCGGCTACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACATAGGGGGCGAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAG
GCGGTTAGGAAAGTCTATAATTTAATTCAGTGCTTAACGCTGCTTTGTTATAGAACTACCTTGACTAGAGTTAGATAGAGGCAAGCGGA
ATTCCATGTGTAGCGGTAATAATGTGTAATATATGGAGGAACACCAGAAGCGTAGGCGGCTTGTGGGCTTTGACTGACGCTGAGGCAC
GAAAGCGTGGGTAGCAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGAGTACTAAGTGTCCGGATAAACTCGGTACTG
AAGTTAACACATTAAGTACTCCGCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCGGTGGATC
ATGTTGTTAATTCGAAGATACACGAAAAATCTTACCAGGTCTTGACATGCTCTGCAAAGTTATAGAAA

>MF07 i40 (L99 Seg) HG764383

GGCACATAGTTACCGGGGCTTATTCATGAATAACGTCAGATAGTTTTTCCAATATTTTTTCTTCTTCAATAAAAGAACTTTACATACCGAA
ATACTTCATCGTTACGCGGCGTTGCTCGGTGAGAGTTTCTCCATTGCCGAAAATCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCG
TGTCTCAGTCCCAATGTGGCTGTTGACCTCTCAATCCAGCTACACATCATCGTCTTGGTAGGCCATTAAGCACCCCGAACTAATGTGG
CGCAAGCTCATCTTAAAGCATACCTCCGAAAAAGGTCTTAAAAATAAAAGATGC

>MF08 Pool1(Contig RM46) HG764384

CGTATAATATAGCCCCGGCTACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACATAGGGGGCGAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGT
GCGTAGGCGGTTAGGAAAGTCTATAATTTAATTTCAAGTGCCTAACGCTGCTTTGTTATAGAACTACCTTGACTAGAGTTAGATAGAGGCA
AGCGGAATTCATGTGTAGCGGTAATAATGTGTAATATATGGAGGAACACCAGAAGCGTAGGCGGCTTGTGGGCTTTGACTGACGCTG
AGGCACGAAAGCGTGGGTAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGAGTACTAAGTGTCCGGATAAACTCG
GTACTGAAAGTTAACACATTAAGTACTCCGCTGAGTAGTACGTCAGCAAGTATGAACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCGG
TGGATCATGTTGTTAATTCGAAGATACACGAAAAATCTTACCAGGTCTTGACATGCTCTGCAAAGTTATAGAAA

>MF08 Pool1 (L100 Seg) HG764385

GTTTTCCACTATTTTTCTTCTCAATAAAAGAACTTTACATACCGAAATACTTCATCGTTCACGCGGCGTTGCTCGGTGAGAGTTTCTCC
ATTGCCGAAAAATCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGCTCAGTCCCAATGTGGCTGTTGACCCCAACAGCTACACA
TCATCGTCTTGGTAGGCCATTAACCAACTAATGTGGCGCAAGCTCATCTTAAACATACCTCCGAAAAAGGTCTTAAAAATAAAAGATG
CC

>MF09 Pool2 (Contig RM47) HG764386

AATAAGCCCGGCTACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACATAGGGGGCGAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAC
GCGGTTAGGAAAGTCTATAATTTAATTTCAAGTGCCTAACCCCTGCTTTGTTATAGAACTACCTTGACTAGAGTTAGATAGAGGCAAGCGGA
ATTCCATGTGTAGCGGTAATAATGTGTAATATATGGAGGAACACCAGAAGCGTAGGCGGCTTGTGGGCTTTGACTGACGCTGAGGCAC
GAAAGCGTGGGTAGCAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGAGTACTAAGTGTCCGGATAAACTCGGTACTG
AAGTTAACACATTAAGTACTCCGCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCGGTGGATC
ATGTTGTTAATTCGAAGATACACGAAAAATCTTACCAGGTCTTGACATGCTCTGCAAAGTTATAGAAA

Secuencias obtenidas en frijoles post-inoculación con cicadélidos

> Frijol2 MF04TF03 RI26

GGGTATTGCCAACTTTCTGGTTTGACGGGCGGTTGTACAAACCCCGAGAAGCTATTCACCGCGACATGCTGATTCGCGATTACTAGC
GATTCCAAATTCATGAAGTCGAGTTGCAGACTTCAATCCGAAGCTGAGACTGTTTTTTGAGATTCGCCAAAACTTGCCTTCAAGCTACCC
TTTTAACAGCCATTGTATCACGTTTGTAGCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTGACGTCGTCGCCACCTTCCCAATTCATCACTG
GCAGTCTTGTCTAAAGTCCCCACCTTACGTGCTGGTAACATAACAAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCCAACATCTCACGACA
CGAGTACGACAAACCATGCACCACCTGTGCAACTGATAAACCCTGCTGTTTCTACAGCTTTGCAGAACGATGCAAGACCTGGTGAG
GTTTTTCGGTACCCTGAAATTAACAACATGATCCACCCTGTGCGGAGTCCCGTCAATTCCTTTAAGTTTTCATCTTCCGCTACT
ACTCAGGCGGAGTACTTAATGTGTTAACTTCAACACTGGTTTTACCACCGTTTAGTACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATC
TAATCCTGTTTGTCTCCACGCTTTCGTGCCTCAGCGTCAGTAAAGACCCAGCAAGCCGCTTCCGCTACTGGTGTCTCCATATATTTA
CGCATTTTACCACATACATGGAATTCACCTTGCCTCTACTTACTAGTAAACAGTTTTTATAGCATCACATGTTGAGCATTGCACTT
AGACATAAACTTATTTAACCGCTACGCACCTTTACGCCAATAAATCCGGATAACGCTTGCCTTATGTTATACCGCGCTGCTGG
CACATAGTTAGCCGGGGCTTATTCATTAGGTACCGTCAAGATGATTTTTCCATCATTATTTCTCCCTAATAAAAGAACTTTACGTACCGAA
ATACTTCATCGTTCACGCGGCGTTGCTCGGTGAGAGTTTCTCCATGCCCAGAAATCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCG
TGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGTTTAAAGTCTCAGCCCGGCTACACATCATAGTCTTGGTAGGCCCTTACCCCAACCACTAACTAATGTG
ACGCAAGCTCCTCCCTAAGCATACCTATTGCTAGGTCTTTTAAAAACAAGAAGATGCCCTTGTCTCCTATCCAGTCTTAGCAGTCTGTT
CCAAGTATTCTCGTATTAGGGGCGAGATCGCATACGCGTACTCACCCGTCGCCACTAAA

> Frijol19 MF06 TF22 RI40

ACTGTTTTTTGAGATTCGCCAAAACTTGGGTTTTAGCTACCCTTTGTAACAAGCCATTGTATCACGTTTGTAGCCAGGTCATAAGGG
GCATGATGATTTGACGTCGTCGCCACCTTCTCCAAATTCATCACTGCGAGTCTTGTCAAAGTCCCAACATTACGTGCTGGTAACTAACAA
TAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGACTTAACCCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCAACCTGTGCAACTGATAACCTC
CACTGTGTTTTCTACAGCTTTGCAAGAGCATGCAAGACCTGGTGAGGTTTTTTCGGTACCTTCAATTAACAACATGATCCACCGGTTGT
GCGGAGTCCCGTCAATTCCTTTAAGTTTTCATACTTGCCTGACTACACTAGACCAATAAATTTAACCAGCTACGCACCTTTACGCCCAAT
CCAACTTTAGTACTCATCGTTTACGCGGTGGACTACCAAGGTTATCTAATCCTGTTTGTCTCCACGCTTTCGTGCTCAGCGTACGATA
AGACCCAGCAAGCCGCTTCCGCTACTGGTGTCTCCATATATTTACGCATTTTACCCTACACATGGAATTCACCTTGCCTCTATCTTAC
TCTAGCTAAACAGTTTTTATAGCATCACAAATGTTGAGCATTGCACTTAGACCAATAAATTTAACCAGCTACGCACCTTTACGCCCAAT
AATTCGGATAACGCTTGCCTTATGATTACCGCGGCTGCTGGCACATAGTTAGCCGGGGCTTATTCATTAGGTACCGTACAGATGAT
TTTTCCATCATTATTTCTCCCTAATAAAAGAACTTTACGTAACCGAAATCTTATCCTGTTACGCGCGGTTGCTCGGTGAGAGTTTCTCCA
TTGCCGAAAAATCCCTACTGCTGCCTCCGCTAGGAGTTTGGCCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGTTTAACTCTCAGCCCGGCTAC
ACATCATAGTCTTGGTAGGCTTTACCCCGCAACTAACTAATGTGAGCGCAAGCTCCTCCCTAAGCATACCTATTGCTAGGTCTTTAAAA
ACAAGAAGATGCCCTTGTCTCCTATCCAGTCTTAGCAGTCTTCCAAGTATTCTCTGCTTAGGGGCGAGATTGCTTACGCGTACT
CACCCGTCGCCA

>TF09 ContigRI39 Frijol8 MF06

CTTCTTGGGAGTTAGGCCGCGGCTTGGGGTATTGCCATTTCTGGTTTGTGACGGGCGGTGTGTACAAACCCCGAGAAGCTATTACCGG
CGACATGCTGATTCGCGATTACTAGCGATTCCAATTCATGAAGTCGAGTTGACAGACTTCAATCCGAAGTACTGACTGTTTTTTGAGATTC

GCCAAAACTTGCCTTCAGTACCCTTTGTAACAGCCATTGTATCACGTTTGTAGCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTGC
 TCCCACCTTCCCAATTCATCACTGGCAGTCTTGTAAAGTCCCCACCTTACGTGCTGTAACAACTAAGGGTTGCGCTCGTTGC
 GGAGCTAAACCAACATCTCAGACACGAGCTGACGACACCATGACACCATGACACCTGTGCAACTGATAACCTCCACTGTGTTCTACAGCTTT
 GCAGAAGCATGTCAAGACCTGGTGAGGTTTTTCGGGTACCTTCAAAATTAACAACATGATCCACCCTGTGCGGAGTCCCGTCAATTTCC
 TTTAAGTTTCATACTTGCCTACGTACTACTCAGGCGGAGTAAATGTGTTAACTTCAACACTGGTTTTACCACCGTTTAGTACTACGCT
 TTTACGGCGTGGACTACCAGGGTACTAATCTGTTTGTCCCCAGCTTTCGTGCCTCAGCTCAGTAAAGACCCAGCAAGCCGCTT
 CGCTACTGGTGTCCCTCCATATATTTACGCATTTTACCCTACACATGGAATCCACTTGCCTTACTCTAGCTAAACAGTTTTTATA
 GCATCACAAATGTTGAGCATTGCCTTACGACCAAACTTATTTAACCGCCTACGCACCTTTACGCCAATAAATCCGGATAACGCTTGGC
 CCCTATGTTACCGCGGCTGTGGCACATAGTTAGCCGGGCTTATTCATTAGGTACCGTCAGAATGATTTTTCCATCATTTATCTTCC
 CTAATAAAGAACTTTACGTACCGAAATCTTACGCTTACCGCGGCTTTCGGTCAAGAGTTTCCCTCCATTGCCGAAATTTCCCTACTG
 CTGCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGTCAACCTCTCAGCCCGGCTACACATCATAGCTTGGTAGGC
 CTTTACCCCACTAACTAATGTGACGCAAGCTCCTCCCTAAGCATACTATTGCTAGGTCTTTAAAAACAAGAAGATGCCCTTCTGT
 CTCTATCCAGTTAGCAGTCTTTCAACTGTTATCTCGTCTTAGGGGCGAGATTGCTTACGCGTTACTCACCCTCGCCA

>TF19 ContigRI34 Frijol6 MF06

GGCCGCGGCTTGGGGTATTGCCAATTTCTGTTGTTGACGGGCGGTGTGTACAAACCCCGAGAAGCTATTCACCAGCATGCTGATT
 CGCGATTACTAGCGATTCCAATTCATGAAGTCGAGTTGCGAGACTTCAATCCGAAGTGAAGTGTTTTTGAGATTGCGCAAAAACTTGC
 GCTTCAGTACCCTTTGTAACAGCCATTGTATCACGTTTGTAGCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTGCTCCACCTTCT
 CCAATTAACACTGGCAGTCTTGTAAAGTCCCACTTACGTGCTGGTAACTAACAATAAGGGTTGCGCTGTTGCGGAGCTTAAACCC
 AACATCTCAGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTGCAACTGATAACCTCCACTGTGTTTCTACAGCTTTGCAAGAAGCATGT
 CAAGACCTGGTGGGTTTTTCGGGTACCTTCAAAATTAACAACATGATCCACCCTTGTGCGGAGTCCCGTCAATTCCTTTAAGTTTCATA
 CTTGCGTACTACTACTCAGGCGGAGTAAATGTGTTAACTTCAACACTGGTTTTACCACCGTTTAACTACTCATCGTTTACGCGGTGG
 ACTACCAGGTATCTAATCTGTTTGTCCCAAGCTTTCGTGCCTCAGCTCAGTAAAGACCCAGCAAGCCGCTTTCGCTACTGGTGT
 CCTCCATATATTTACGCATTTTACCCTACACATGGAATCCACTTGCCTTACTCTACTAGTAAACAGTTTTATAGCATCAATGTT
 GACTTGCCTTACGACCAAACTTATTTAACCGCCTACGCACCTTTACGCCAATAAATCCGGATAACCGTTGCCCTATGATTAC
 CGCGCTGCTGGCACATAGTTAGCCGGGCTTATTCATTAGGTACCGTCAGAATGATTTTTCCATCATTTATCTTCCCTAATAAAGAAC
 TTACGTTACCGAAATCTTCACTGTTACGCGGCGTGTCTCGGTGAGTTCCTCCATTGCCGAAATTTCCCTACTGCTGCCCTCCCGTA
 GAGTTTTGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGTCAACCTCTCAGCCCGCTACACATCATAGCTTGGTAGGCCTTTACCCACCC
 AACTAATTAATGTGACGCAAGCTCCTCCCTAAGCATACCTATTGCTAGGTCTTTAAAAACAAGAAGATGCCCTTCTGTCTCTATCCAGT
 CTTAGCAGTCTTTCAACTGTTATCTCGTCTTAGGGGCGAGATTGCTTACGCGTTACTCACCCTCGCCACTAAA

>TF12 ContigRI32 Frijol3 MF04

AGTGGACGGGTGAGTAAACGCTAAGCAATCTGCCCTAAGACGAGGATAACAGTTGGAAACGACTGCGAAGACTGGATAGGAGACAAG
 AAGGCATCTTCTTTGTTTTAAAAGACTAGCAATAGGTATGCTTAGGGAGGAGCTTGCCTCACATTAGTTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCT
 ACCAAGACTATGATGTGTAGCCGGCTGAGAGGTTGAACGGCCACATTTGGGACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAG
 TAGGGAATTTTCGGCAATGGAGGAACTCTGACCAGCAACGCCGCTGAACGATGAAGTATTTCCGGTACGTAAGGTTCTTTTATAGGG
 AAGAATAAATGATGAAAAAATCATTCTGACGGTACCTAATGAATAAGCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGGG
 GCAAGCTTATCCGAATTTATGGCGTAAAGGGTGCCTAGCGGTTAAATAAGTTTATGTCTAAGTCAATGCTCAACATTGTATGC
 TATAAAAACTGTTAGTAGAGTAAGTAGAGGCAAGTGAATTCATGTGTAGTGGTAAAAATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAGTAG
 CGAAGCGGCTTGTGGGTTTTACTGAGCCTGAGGCACGAAAGCCTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCAGCCGT
 AAACGATGAGTACTAAACGTTGGGTAACCAGTGTGAAGTTAACACATTAAGTACTCCGCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAACT
 TAAAGGAATTCAGCGGACTCCGCAACAGCGTGGATCATGTTGTTTAAATTCGAAGGACCCGAAAACTCCCGAGGCTTGCATGCTTC
 TGCAAGCTGTAGAACACAGTGGAGGTTATCAGTTGCACAGGTGGTGCATGTTGCTGTCAGTCTGTCTGTTGGGTTAATCCCG
 CAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTACCAGCAGTAAATGGTGGGACTTTAGCAAGACTGCCAGTATGAAATGAAGGAAGGTGGG
 ACGAGCTCAAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACAAAGCTGATACAAATGGCTGTTACAAAGGGTACGTGAAGCGCAAGTTTTG
 GGAATTTCAAAAAACAGTCTCAGTTCCGATTGAAGTCTGCAACTGACTTCAAGATTGGAAATCGTAGTAAATCGGAATCAGCATGTC
 GCGGTGAATACGTTCTCGGGTTTTGTACACACCCCGCTCAA

>Frijol2MF04_TF11 Phy mF2/MR1

ACCGGCGGTGGGTACAACCCCGAGAGACGGTATACCCGGGACAAGTGGATTCCGGGATACTAGCGATTCCAACCTCAGGAAGTCGAGT
 GCCAGCTCAATCCGAAGTACGACTGTTTTGAGATTCGCCAAAACTTGGCCTTACGATACCTTTGTAACAGGCTATGATACAGTTT
 GTAGCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCTGCCACCTTCCCTCAATTCATCACTGGCAGTCTGTAAGGTTCCCAACCAT
 TACGTGCTGGTAACTAACAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGACTTAAACCAACATCTCAGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCA
 CCTGTGCAACTGATAACCTCCACTGTGTTTCTACAGTCTTGCAGAAGCATGCAAGACTGGTGGGTTTTTCGGGTACCTTCAAAATAAA
 CAACATGATCCACCCTTGTGCGGAGTCCCGTCAATTTCCCTTAAAGTTTACACTTGGCTACGTACTACTCAGGCGGAGTACTTAAATGT
 AACTTCAACACTGGTTTTACCACGTTTACTACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCTGTTTGTCCCCAGCTTT
 CGTGCCCTACGCTCAGTAAAGACCCAGCAAGCCGCTTTCGCTACTGGTGTCTCCATATATTTACGCATTTTACCCTACACATGGAAT
 TCCACTTGCCTTACTTACTCTAGCTAAAACAGTTTTTATAGCATCAAAATGTTGAGCATTGCCTTACGACCAATAAATTTAAACCGCT
 ACGCACCTTTACGCCAATAAATCCGGATAACGCTTGCCTTATGATTACCGCGGCTGCTGGCACATAGTTAGCCGGGCTTATTCA
 TTAGGTACCGTCAAGATGATTTTCCATCATTTATTTCCCTCAATAAAGAACTTTACGTACCGAAATATCTCATGTTACCGCGGCGTTG
 TCGGTCAGAGTTTCCCTCAATGCCGAAATTTCCCTACTGCTCCCTCCGTTAGGAGTTTGGCCGTGCTCAGTCCCAATGTGGCCGT
 CAACCTCTCAGCCCGGCTACACATCATAGTCTTGGTAGGCCTTTACCCCACTAATTAATGTGACGCAAGCTCCTCCCTAAGCATAC
 CTATTGCTAGGTCTTTAAAAACAAGAAGATGCCCTTCTGTCTCTATCCGGTCTTAGCAGTCTGTTT

>Frijol5MF04_TF06

ACGGGCGGTGTGTACAACCCCGAGAAGCTATTACCCGGAAGTGGTATACGCAATTCAGCATCCAGTCCATAGTGGAGTCCGATCAT
 CGGACTGAAGTTTTTCGATGCAATCCTGCGCTCAGTACTGTACAGCATGTATACGTTAGCCAGTCATAGGCATGATGATGGAGTGC
 GTCCACTCTTTCATCATCACTGCAGTCTGCTAAGTCCACATAACGTGCTGACTACATAGGGTGGGCTGCGCTGCGGGACTACCCCAACATC
 TCAGCACAGAGTGCAGACACCATGCACCCTGTGCAACTGATAACCTCAGTGTGTTTCTACAGCTTTGCAGAGCATGTCAAGACC
 TGAGGAGTTTTTCGGGTACCTTCAAAATTAACAACATGATCCACCGCTTGTGCGGAGTCCCGTCAATTTCTTAAAGTTTACTACTTCTG
 ACGTACTACTCAGGCGGAGTACTAATGTGTTAACTTCAACACTGGTTTTACCACCGTTTACTACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCA
 GGGTATCTAATCTGTTTGTCCCCAGCTTTCGTGCCTCAGGCTCAGTAAAGACCCAGCAAGCCGCTTCCGCTACTGGTGTCTCTCAT
 ATATTTACGCATTTTACCCTACACATGGAATTCACCTTGCCTTACTCTAGCTAAACAGTTTTTATAGCATCAAAATGTTGAGCATT
 GCACCTTAGACATAAACTTTAATCCCGCTACGCACCTTTACGCCAATAAATCCGGATAACCGTTGCCCTTACCGGCTTACCGCGGCT
 GCTGGCACATAGTTAGCCGGGCTTATTCATTAGGTACCGTCAAGATGATTTTTCCATCATTTATCTTCCCTAATAAAGAACTTTACGTA
 CCGAAATACTTACGTTTACGCGGCGTGTCTCGGTGAGTTCCTCCATTGCCGAAATTTCCCTACTGCTGCCCTCCGTTAGGTTG
 GGCCGTGCTCAGTCCCAATGTGGCCGTTCAACCTCAGCCCGGCTACACATCA TAGTCTTGGTAGGCCTTTACCCCACTAAGTAACTA

ATGTGACGCAAGCTCCTCCCTAAGCATACCTATTGCTAGGCTTTTTAAAAACAAGAAGATGCCTTCTGTCTCCTATCCAGTCTTAGCAGT
CGTTTC

>Frijol6MF06_TF07

ACGGGCGGTGTGTACAACCCCGAGAAGTATTCACCGCGACATGCTGTATCCGCGGATTACTGGAGTCGATTCCAGACTTCATGAAGT
CCAGTTCGTCAGACTCCAATCCGAAGTGAAGTGTGTTTTGAGATTGCGCAAAAACTTGCCTTCAGCTACCCCTTGTAAACAGCCATTGGA
TCACGGTTGTAGCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATGTGACGTCGTCGCCACCTTCTCCAATTCATCACTGGCAGTCTTGCTAAAGTC
CCCACCTTACGTCGTTAACTAACAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACC
ATGCACCACCTGTGCAACTGATAACCTCCACTGTGTTTCTACAGCTTTGAGCAAGCATGTCAAGACCTGGTGAGGTTTTTCGGGTACCTT
CGAATTAACAACATGATCCACCGCTGTGCGGAGTCCCGTCAATTCCTTAAAGTTTCATACTTGGTACGTAAGTACTACTCAGGCGGAGTACT
TAATGTGTTAACTTCAACACTGGTTTTACCCAACGTTTAGTACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTC
CCCACGCTTTCGTGCTCAGGTCAGTAAAGACCCAGCAAGCGGCTTCGCTACTGGTGTTCCTCCATATATTTACGCATTTTACCACATA
CACATGGAATTCACCTTGCCTCTATCTTACTCTAGCTAAACAGTTTTATAGCATCACAAATGTTGAGCATTGCACCTAGACCATAAACTTAT
TTAACCGCTACGCAACCTTTACGCCAATAATCCGGATAACGCTTGCCCCCTATGTATTACCGCGGCTGCTGGCACATAGTTAGCCGG
GGCTTATTCATTAGGTACCGTCAGAATGATTTTCCATCATTTTCTTCCCTAATAAAAAGAACTTTACGTACCGAAATACTTCATCGTTTAC
GCGGCGTGTGCTGGTCAGAGTTTCTCCATTGCCGAAAATCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGCCGTGTCTCAGTCCCAAT
GTGCGCGTTCAACCTCTCAGCCCGGTACACATCATAGTCTTGGTAGGCCTTTACCCACCAACTAACTAATGGGACCCAAGCTCCTCCC
TAAGCATACCTATTGCTAGGCCTTTTAAAAACAAGAAAAGCTCTTCTGGTCTCCTATCAAGCTTAAACAGCCGTTTC

>Frijol6MF06_TF19

ACGGGCGGTGTGTACAACCCCGAGAAGTATTCACCGCGACATGCTGATTCCGCGATTACTAGCGATTCCAACCTTCATGAAGTCGAGTT
GCAGACTTCAATCCGAAGTGAAGTGTGTTTTGAGATTGCGCAAAAACTTGCCTTCAGCTACCCCTTGTAAACAGCCATTGTATCACGTT
TGTAGCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCGTCGCCACCTTCTCCAATTCATCACTGGCAGTCTTGCTAAAGTCCCACCA
TTACGTCGTTAACTAACAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACC
ACCTGTGCAACTGATAACCTCCACTGTGTTTCTACAGCTTTGAGCAAGCATGTCAAGACCTGGTGAGGTTTTTCGGGTACCTTCAATTA
ACAACATGATCCACCGCTGTGCGGAGTCCCGTCAATTCCTTAAAGTTTCATACTTGGTACGTAAGTACTACTCAGGCGGAGTACTTAATGTG
TAACTTCAACACTGGTTTTACCCAACGTTTAGTACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTT
TCGTGCTCAGCGTCAGTAAAGACCCAGCAAGCGGCTTCGCTACTGGTGTTCCTCCATATATTTACGCATTTTACCACATACACATGGAA
TTCCACTTGCCTCTATCTTACTCTAGCTAAACAGTTTTATAGCATCACAAATGTTGAGCATTGCACCTAGACCATAAACTTATTTAACCGCC
TAGCACCCCTTTACGCCAATAATCCGGATAACGCTTGCCCCCTATGTATTACCGCGGCTGCTGGCACATAGTTAGCCGGGCTTATTC
ATTAGTACCGTCAGAATGATTTTCCATCATTTTCTTCCCTAATAAAAAGAACTTTACGTACCGAAATACTTCATCGTTTACCGCGGCTT
GCTCGGTCAGAGTTTCTCCATTGCCGAAAATCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGT
TCAACCTCTCAGCCCGGTACACATCATAGTCTTGGTAGGCCTTTACCCACCAACTAACTAATGTGACGCAAGCTCCTCCCTAAGCATA
CCTATTGCTAGGCTTTTTAAAAACAAGAAGATGCCTTCTTGTCTCCTATCCAGTCTTAGCAGTCGTTTC

>Frijol5-MF04_TF14 (RI56)

TTTCTAATACTTTCAGAGCATGTCAAGACCTTTTGGTAATGTATATTTATCGCGTATCTTCCAATTATACTACAACATGATCCACCGCTTG
TGCGAGTCCCGTCAATTCCTTTAAGTTTCATACTTGCCTACGTAAGTACTACTAGGCGGAGTACTTAATGTGTTAACTTCAGTACCGAGTTTT
ATCCCGACACTTAGTACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCGAGGTATCTAATCCTGTTTGCTACCCACGCTTTCGTGCTCAGCGCTCAG
TCAAGACCCAGCAAGCCGCTACGCTTCTGGTTCCTCCATATTTACACATTTTACCGCTACACATGGAATTCGCTTGCCTCTATCT
AACTCTAGTCAAGGTAGTTTCTAATAACAAGACAGCGTTAAGCATGAAATTAATAATAGACTTTTCTAACCGCTACCGACCTTTACGC
CCAATAATTCGGATAACGCTCGCCCCCTATGTCTTACCGCGGCTGCTGGCACATAGTTAGCCGGGGCTATGCATTCATTGAATAACGTC
AAGATAGTTTTTCCACTATA

>Frijol5-MF04_TF14 (RI35)

ACGGGCGGTGTGTACAACCCCGAGAAGTATTCACCGCGGACATGCTGATTCCGCGAGTACTAGGCGATTCCAACCTTCATGAAGTCGAG
TTGCAGACTTCAATCCGAAGTGAAGTGTGTTTTGAGAATCGCAAAAACTTGCCTTCAGCTACCCCTTGTAAACAGCCATTGTATCACG
TTTGTAGCCAAAGTCAATAAGGGGCAAGATGATTGGACGTCGTCGCCACCTTCTCCAATTCATCACTGGCAGTCTTGCTAAAGTCCCAC
CATTACGTCGTTAACTAACAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAATCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAAGCCAT
GCCACCCTGGGCAACTGATAACCTCCACTGTGTTTCTACAGCTTTGAGCAAGCATGTCAAGACCTGGTGAGGTTTTTCGGGTACCTTC
GAATTAACAACATGATCCACCGCTTGTGCGGAGTCCCGTCAATTCCTTAAAGTTTCATACTTGCCTACGTAAGTACTACTCAGGCGGAGTACTT
AATGTGTTAACTTCAACACTGGTTTTACCCAACGTTTAGTACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCC
CCAGCTTTCGTGCTCAGCGTCAGTAAAGACCCAGCAAGCGGCTTCGCTACTGGTGTTCCTCCATATATTTACGCATTTTACCACATC
ACATGGAATTCACCTTGCCTCTATCTTACTCTAGCTAAACAGTTTTATAGCATCACAAATGTTGAGCATTGCACCTAGACCATAAACTTATTT
AACCGCTACGCAACCTTTACGCCAATAATCCGGATAACGCTTGCCCCCTATGTATTACCGCGGCTGCTGGCACATAGTTAGCCGGG
GCTTATTCATTAGGTACCGTCAGAATGATTTTCCATCATTTTCTTCCCTAATAAAAAGAACTTTACGTACCGAAATACTTCATCGTTTACG
CGGCTTGCCTGGTCAGAGTTTCTCCATTGCCGAAAATCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGCCGTGTCTCAGTCCCAATG
GGGCGGTTCAACCTCTCAGCCCGGTACACATCATAGTCTTGGTAGGCCTTTACCCACCAACTAACTAATGGGACCCAAGCTCCTCCCT
AAGCATACCTATTGCTAGGCCTTTTAAAAACAAGAAAAGTGGCCTTCTTGGTCTCCTATCAAGCTTAAAAACCGTTTC