



La Revista Chapingo Serie
Zonas Áridas de la Universidad
Autónoma Chapingo está bajo la
licencia de Creative Commons
Reconocimiento-NoComercial-
4.0 Internacional.

Detection of *Candidatus Phytoplasma trifolii* in dry chili plants with big bud symptoms

Detección de *Candidatus Phytoplasma trifolii* en plantas de chile para secado con síntomas de yema grande

Rodolfo Velásquez-Valle^{1*}; Yasmin Ileana Chew-Madinaveitia²;
Luis Roberto Reveles-Torres³; Biridiana Lozano-Hipólito⁴

¹Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Campo Experimental Pabellón, km 32.5 Carretera Aguascalientes – Zacatecas, Pabellón de Arteaga, Ags. C. P. 20660. México.

²Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Campo Experimental La Laguna, Blvd. José Santos Valdez núm. 1200 Pte., Matamoros, Coah. C. P. 27440. México.

³Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Campo Experimental Zacatecas, km 24.5 carretera Zacatecas – Fresnillo, Calera de V. R., Zacatecas, C. P. 98500. México.

⁴Asesor independiente.

*Corresponding author: velasquez.rodolfo@inifap.gob.mx

Abstract

Chili crop in the north-central Mexico is damaged by infection caused by *Candidatus Phytoplasma trifolii*. Disease symptoms include chlorosis, leaf deformation, dwarfism and floral overdevelopment (big bud) with pistil and anther necrosis. The distribution of big buds on the plant is irregular. This suggests that the pathogen or its effectors move irregularly within the plant. Therefore, the objective of this work was to determine the presence of *Candidatus Phytoplasma trifolii* in different organs of chili plants with big bud symptoms. Diseased Mirasol type chili plants were collected from a commercial field in Zacatecas, Mexico, and their roots, stems, leaves, fruits and big buds were analyzed by universal and nested PCR for the presence of the phytoplasma. The pathogen was detected in five of eight plants tested, in at least one organ of each plant; however, its distribution within plants was irregular. The percentage of detection was 33.3, 62.5, 70, 80, and 100 % in roots, leaves, stems, fruits, and large buds, respectively. In fruits of chili plants symptomatic to big buds, the phytoplasma was detected in the peduncle, placenta, and seeds.

Keywords: *Candidatus Phytoplasma trifolii*, PCR, incidence, distribution.

Resumen

El cultivo de chile en el norte centro de México es dañado por la infección causada por *Candidatus Phytoplasma trifolii*. Los síntomas de la enfermedad incluyen clorosis, deformación foliar, enanismo y sobredesarrollo floral (yema grande) con necrosis de pistilo y anteras. La distribución de yemas grandes en la planta es irregular. Ello sugiere que el patógeno o sus efectores se moverían irregularmente dentro de la planta. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue determinar la presencia de *Candidatus Phytoplasma trifolii* en diferentes órganos de plantas de chile con síntomas de yema grande. Plantas enfermas de chile tipo Mirasol fueron recolectadas en una parcela comercial en Zacatecas, México, y sus raíces, tallos, hojas, frutos y yemas grandes fueron analizadas por PCR universal y anidada para detectar la presencia del fitoplasma. El patógeno fue detectado en cinco de ocho plantas analizadas, en por lo menos un órgano de cada planta; sin embargo, su distribución dentro de las plantas fue irregular. El porcentaje de detección fue 33.3, 62.5, 70, 80 y 100 % en raíces, hojas, tallos, frutos y yemas grandes, respectivamente. En frutos de plantas de chile sintomáticas a yema grande, el fitoplasma fue detectado en el pedúnculo, placenta y semillas.

Palabras clave: *Candidatus Phytoplasma trifolii*, PCR, incidencia, distribución.

Please cite this article as follows (APA 7): Velásquez-Valle, R., Chew-Madinaveitia, Y. I., Reveles-Torres, L. R., & Lozano-Hipólito, B. (2023). Detection of *Candidatus Phytoplasma trifolii* in dry chili plants with big bud symptoms. *Revista Chapingo Serie Zonas Áridas*, 22(1). <https://doi.org/10.5154/r.rchsza.2023.22.01>



Revista Chapingo
Serie Zonas Áridas

Introduction

Among the diseases that damage chili crop (*Capsicum annuum* L.) for drying in north-central Mexico, the so-called big bud stands out. This is associated with infection by *Candidatus Phytoplasma trifolii* located within the phylogenetic group 16SrVI and hereafter called CPT, transmitted by the beet leafhopper (*Neoliturus tenellus* Baker) (Mauricio-Castillo et al., 2015). The disease has been identified on chili plants in New Mexico and Arizona in the United States of America, Iran and Turkey (Randall et al., 2009; Randall et al., 2011; Faghigi et al., 2016; Zibadoost et al., 2016; Çarpar and Sertkaya, 2022). Symptoms associated with CPT infection of chili plants include lanceolate leaves with chlorotic or yellow margin, dwarfism or bushy dwarfism, as well as overdevelopment of sepals or big bud (BB) and anther or pistil necrosis leading to yield loss. However, the manifestation of symptoms, specifically BB, may be partial or complete. In most cases, the affected plants do not develop fruits, but occasionally they manage to keep those originated in the first blooms, while the young fruits, when formed, have no commercial value. On the other hand, some symptoms such as BB and leaf deformation are also expressed in the shoots originated in the stem of the plants. This suggests that the pathogen or, possibly, its effectors once introduced into the phloem of the plant could move regularly causing the “disordered” distribution of some symptoms. The irregular distribution of the phytoplasmas has been mentioned by Christensen et al. (2004) in plants of *Euphorbia pulcherrima* Willd. Ex Klotzch. Therefore, it is important to obtain information on how CPT invades various organs of chili plants and the distribution of its symptoms within the plant to improve the sampling of the disease in the field and the detection of the phytoplasma in the laboratory. Therefore, the objective of this work was to determine the presence of *Candidatus Phytoplasma trifolii* (16SrVI) in different organs of chili plants with BB symptoms.

Materials and methods

Whole Mirasol type chili plants for drying were collected in a commercial field located in Morelos, Zacatecas (22.865667 latitude North, -102.584558 longitude West, 2158 masl). These plants showed the typical symptoms associated with CPT infection (BB and deformed and chlorotic foliage). Immediately after extraction, the plants were transferred to the laboratory of Molecular Biology of the National Institute of Forestry, Agricultural and Livestock Research, Experimental Field Zacatecas. Phytoplasma detection in root, stem, leaves, fruit (including seed, placenta and pericarp portions) and BB samples from the chili plants collected was by 16S ribosomal gene amplification with universal polymerase chain reaction (PCR)

Introducción

Entre las enfermedades que dañan al cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.) para secado en el norte centro de México destaca la denominada yema grande. Esta se asocia con la infección por *Candidatus Phytoplasma trifolii* ubicado dentro del grupo filogenético 16SrVI y denominado en adelante CPT, transmitido por la chicharrita del betabel (*Neoliturus tenellus* Baker) (Mauricio-Castillo et al., 2015). Dicha enfermedad ha sido identificada en plantas de chile en Nuevo México y Arizona en los Estados Unidos de América, Irán y Turquía (Randall et al., 2009; Randall et al., 2011; Faghigi et al., 2016; Zibadoost et al., 2016; Çarpar y Sertkaya, 2022). Los síntomas asociados con la infección de plantas de chile por CPT incluyen hojas lanceoladas con el borde clorótico o amarillo, enanismo o enanismo arbustivo, así como el sobredesarrollo de los sépalos o yema grande (YG) y la necrosis de anteras y pistilo que conducen a la pérdida de la producción. Sin embargo, la manifestación de síntomas, específicamente YG, puede ser parcial o completa. En la mayoría de los casos, las plantas afectadas no desarrollan frutos, pero ocasionalmente llegan a conservar los originados en las primeras floraciones, mientras que los frutos jóvenes, cuando son formados, carecen de valor comercial. Por otro lado, algunos síntomas como YG y deformación foliar también se expresan en los rebrotes originados en el tallo de la planta. Lo anterior sugiere que el patógeno o, posiblemente, sus efectores una vez introducidos en el floema de la planta podrían moverse irregularmente provocando la distribución “desordenada” de algunos síntomas. La distribución irregular de los fitoplasmas ha sido mencionada por Christensen et al. (2004) en plantas de *Euphorbia pulcherrima* Willd. Ex Klotzch. Entonces, lo importante es obtener información sobre la forma en que CPT invade diversos órganos de las plantas de chile y la distribución de sus síntomas dentro de la planta para mejorar los esquemas de muestreo de la enfermedad en campo y la detección del fitoplasma en el laboratorio. Por lo tanto, el objetivo del trabajo consistió en determinar la presencia de *Candidatus Phytoplasma trifolii* (16SrVI) en diferentes órganos de plantas de chile con síntomas de YG.

Materiales y métodos

Plantas completas de chile tipo Mirasol para secado se recolectaron en una parcela comercial ubicada en Morelos, Zacatecas (22.865667 latitud Norte, -102.584558 longitud Oeste, 2158 msnm). Estas plantas mostraban los síntomas típicos asociados con la infección por CPT (YG y follaje deforme y clorótico). Inmediatamente después de extraídas, las plantas fueron trasladadas al laboratorio de Biología Molecular del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias-Campo Experimental Zacatecas. La detección de fitoplasmas en las muestras de raíz, tallo, hojas, fruto (incluyendo

oligonucleotides. In direct PCR, the oligonucleotides P15'-AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT-3' and Tint 5'-TCAGGCGTGTGCTCTAACCAGC-3' amplifying a 1700 pb fragment were used (Smart et al., 1996); in the nested PCR, the oligonucleotides used were R16F2n 5'-GAAACGACTGCTAAGACTGG-3' and R16R2 TGACGGGCGGTGTGTACAAACCCCG-3' which amplify a 1250 pb (Gundersen and Lee, 1996). The reaction mixture contained 2.5 µL of PCR buffer (10×), 1.5 µL of MgCl₂ (50 mM), 2.5 µL of dNTPs (20 pM), 0.5 µL of each oligonucleotide (20 pM), 0.25 µL of Taq polymerase (5 U/µL), 25 µL of DNA extract (50 ng/µL) and sterile milli Q water for a final volume of 25 µL. In nested PCR, 1 µL of the direct PCR product was used and volumetrically made up to a final volume of 25 µL with the relation mixture. Amplification recreations were performed with a 2720 Thermal Cycler of Applied Biosystems® (USA), with 35 cycles of 1 min denaturalization at 95 °C (3 min at 95 °C in the first cycle), 1 min alignment at 56 °C and an extension of 2 min at 72 °C (5 min in the last cycle). The obtained products were re-amplified with 35 cycles of denaturalization of 1 min at 94 °C (3 min in the first cycle), alignment of 1 min at 55 °C and one extension of 2 min at 72 °C (5 min in the last cycle). PCR products were analyzed by electrophoresis on a 1.2 % agarose gel, stained with ethidium bromide and visualized by UV light. DNA from the extracts of the chili samples was used as a quencher in the PCR. Sterile milli Q water was used as negative control (Mauricio-Castillo et al., 2015). In addition, seven fruits from plant 7 were selected because a previous test had been positive for CPT in leaves and BB; from each fruit a sample of each part (peduncle, pericarp, placenta and seeds) was obtained; these samples were then submitted, separately, to the DNA extraction and phytoplasma detection process previously exposed.

Results and discussion

In total, eight plants of Mirasol type chili for drying with symptoms of phytoplasma infection (big bud, dwarfism, chlorotic foliage and deformed fruits) were collected. *Candidatus* Phytoplasma trifolii (16SrVI) was detected in five of these plants in at least one of their organs; this phytoplasma was not detected in the analyzed organs of the other three plants, probably due to the low concentration of the pathogen.

In total, 66 samples were analyzed; all of them came from different organs of the eight plants sampled; in 35 of them, fragments associated with phytoplasma were amplified using the nested PCR technique with the universal oligonucleotide P1/Tint and R16F2n/R16R2. This was confirmed by the presence of a 1250 pb in the extracts analyzed and in the positive control (Figure 1). Some amplification in the negative control (sterile water) was negligible.

porciones de semilla, placenta y del pericarpio) y YG de las plantas de Chile recolectadas fue mediante la amplificación de gen 16S ribosomal con oligonucleótidos universales para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En la PCR directa se utilizaron los oligonucleótidos P15'-AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT-3' y Tint 5'-TCAGGCGTGTGCTCTAACCAGC-3' que amplifican un fragmento de 1700 pb (Smart et al., 1996); en la PCR anidada, los oligonucleótidos usados fueron R16F2n 5'-GAAACGACTGCTAAGACTGG-3' y R16R2 TGACGGGCGGTGTGTACAAACCCCG-3' que amplifican un fragmento de 1250 pb (Gundersen y Lee, 1996). La mezcla de reacción contenía 2.5 µL de buffer de PCR (10×), 1.5 µL de MgCl₂ (50 mM), 2.5 µL de dNTPs (20 pM), 0.5 µL de cada oligonucleótido (20 pM), 0.25 µL de Taq polimerasa (5 U/µL), 2.5 µL de extracto de ADN (50 ng/µL) y agua mili Q estéril para un volumen final de 25 µL. En la PCR anidada se utilizó 1 µL del producto de la PCR directa y se aforó a un volumen final de 25 µL con la mezcla de reacción. Las reacciones de amplificación se realizaron con un termociclador programable 2720 Thermal Cycler de Applied Biosystems® (USA), con 35 ciclos de desnaturalización de 1 min a 94 °C (3 min a 95 °C en el primer ciclo), alineamiento de 1 min a 56 °C y una extensión de 2 min a 72 °C (5 min en el último ciclo). Los productos obtenidos fueron reamplificados con 35 ciclos de desnaturalización de 1 min a 94 °C (3 min en el primer ciclo), alineamiento de 1 min a 55 °C y una extensión de 2 min a 72 °C (5 min en el último ciclo). Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en un gel de agarosa al 1.2 %, teñidos con bromuro de etidio y visualizados mediante luz UV. El ADN de los extractos provenientes de las muestras de Chile se usó como template en el PCR. El agua mili Q estéril fue utilizada como control negativo (Mauricio-Castillo et al., 2015). Además, siete frutos procedentes de la planta 7 se seleccionaron porque en una prueba anterior había resultado positiva a CPT en hojas y YG; de cada fruto se obtuvo una muestra de cada parte (pedúnculo, pericarpio, placenta y semillas); luego esas muestras se sometieron, por separado, al proceso de extracción de ADN y detección de fitoplasma previamente expuesto.

Resultados y discusión

En total, ocho plantas de Chile para secado tipo Mirasol con síntomas de la infección por fitoplasmas (yema grande, enanismo, follaje clorótico y frutos deformes) fueron recolectadas. *Candidatus* Phytoplasma trifolii (16SrVI) se detectó en cinco de esas plantas en por lo menos uno de sus órganos; ese fitoplasma no se detectó en los órganos analizados de las otras tres plantas, probablemente debido a la concentración escasa del patógeno.

En total, 66 muestras fueron analizadas; todas ellas provinieron de órganos diferentes de las ocho plantas muestreadas; en 35 de ellas se amplificaron fragmentos

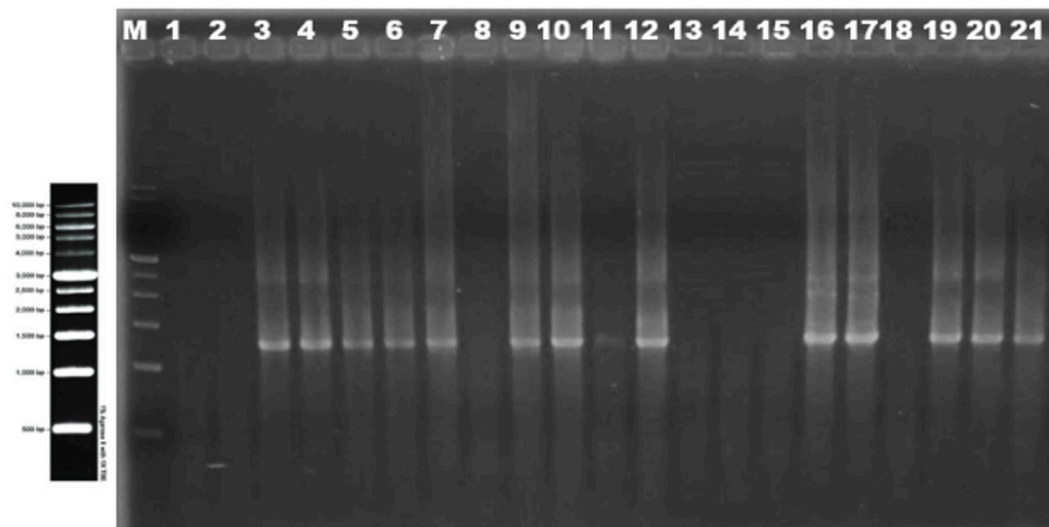


Figure 1. 1.2 % agarose gel electrophoresis showing nested PCR products obtained from Mirasol chili plant extracts using oligonucleotides pairs P1/Tint6 and R16F2n/R16R2. Lane M, 1 kb plus DNA molecular weight marker (Invitrogen Life Technologies); lanes 1 to 22 correspond to chili samples, lane 23: negative control and lane 24: positive control.

Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2 % que muestra los productos del PCR anidado obtenidos a partir de extractos de plantas de chile Mirasol mediante el uso de los pares de oligonucleótidos P1/Tint6 y R16F2n/R16R2. Carril M, marcador de peso molecular de 1 kb plus DNA (Invitrogen Life Technologies); los carriles 1 a 22 corresponden a muestras de chile, carril 23: control negativo y carril 24: control positivo.

The distribution of the phytoplasma in the organs of the five positive plants was disuniform; this is in agreement with the results of Firrao et al. (2007) and Saracco et al. (2006), who mentioned that the phytoplasmas are distributed irregularly in plants and that their concentration varies in plants of the same species, even when inoculate under controlled conditions. The percentage of pathogen detection in the 35 positive samples of this study was 33.3, 62.5, 70.0, 80.0 and 100.0 % in root, leaf, stem, fruit and LB, respectively (Table 1).

The percentage of CPT detection in leaves, from the upper and lower strata of the plants, was 62.5. When analyzing the strata separately, of the 16 leaf samples in total, 13 were from the upper stratum (apical leaves), resulting seven positive samples (53.8 %). Three samples corresponded to the lower stratum (lower or mature leaves) and phytoplasma was detected in all of them (100 %); due to the small sample size, the percentage of detection was increased top 100 (Table 1). Only three samples of mature leaves were included due to the high degree of senescence in this stratum in the rest of the plants.

The presence of the CPT was detected in seven of 10 stem samples analyzed from five plants (Table 1); positive samples came from three plants. In general, the stems of chili plants with BB do not show ostensible symptoms associated with the disease,

asociados con fitoplasmas mediante la técnica de PCR anidado con las combinaciones de oligonucleótidos universales P1/Tint y R16F2n/R16R2. Ello se confirmó con la presencia de un fragmento de 1250 pb, en los extractos analizados y en el control positivo (Figura 1). Alguna amplificación en el control negativo (agua estéril) fue inapreciable.

La distribución del fitoplasma en los órganos de las cinco plantas positivas fue desuniforme; ello concuerda con los resultados de Firrao et al. (2007) y Saracco et al. (2006), quienes mencionaron que los fitoplasmas se distribuyen de manera irregular en las plantas y que su concentración varía en plantas de la misma especie, aún cuando son inoculadas en condiciones controladas. El porcentaje de detección del patógeno en las 35 muestras positivas del presente estudio fue de 33.3, 62.5, 70.0, 80.0 y 100.0 % en las muestras de raíz, hojas, tallo, fruto y YG, respectivamente (Cuadro 1).

El porcentaje de detección de CPT en hojas, de los estratos superior e inferior de las plantas, fue de 62.5. Al analizar los estratos por separado, de las 16 muestras de hojas en total, 13 eran del estrato superior (hojas apicales), resultando siete muestras positivas (53.8 %). Al estrato inferior (hojas de la parte baja o maduras) corresponden tres muestras y en todas ellas fue detectado el fitoplasma (100 %); debido al tamaño reducido de la muestra, el porcentaje de detección se incrementó hasta 100 (Cuadro 1). Solamente se

Table 1. Percentage of detection of *Candidatus Phytoplasma trifolii* in different organs of chili plants for drying Mirasol type with big bud symptomatology (n: 5 plants).

Cuadro 1. Porcentaje de detección de *Candidatus Phytoplasma trifolii* en diferentes órganos de plantas de chile para secado tipo Mirasol con sintomatología de yema grande (n: 5 plantas).

Organ/Órgano	No. positive samples/No. analyzed samples / Núm. Muestras positivas/Núm. Muestras analizadas	Percentage of detection / Porcentaje de detección
Root/Raíz	2/6 ^x	33.3
Leaf/Hojas	10/16	62.5
Stem/Tallo	7/10	70.0
Fruit/Fruto	8/10	80.0
Big bud/Yema grande	8/8	100.0

^xTwo samples were analyzed from one plant.

^xDe una planta se analizaron dos muestras.

although with some frequency a greater number of resprouts are observed along the stem in this type of plants; these resprouts could be attributed to the hormonal imbalance caused by this type of pathogen (Dermastia, 2019).

The percentage of CPT detection in the chili fruit samples was 80.0 % (Table 1); however, three of the eight positive fruits came from early blooms and the rest from more recent blooms at the time of sampling, this could indicate possible early inoculation of these plants that eventually lead to a greater distribution of the pathogen in the plant.

All BB samples from three plants were positive for CPT (Table 1). The BB, modified flowers, could be fast-growing tissues where nutrients and the pathogen are accumulated and conducted by the phloem; this would explain the high detection rate, although it should be noted that, in the other two positive plants, the LB analyzed were negative for CPT, which could indicate that BB expression is not always associated with the presence of CPT or that the concentration of the pathogen is so low that it is undetectable.

The root has been reported as one of the organs where the phytoplasma concentration tends to be higher, as reported by Carminati et al. (2021) and Ebadi et al. (2020) in tomato plants infected by grafting with *Candidatus Phytoplasma solani* (CPs) and with *Candidatus Phytoplasma australasiae*. In the present work, the percentage of detection in the roots was the lowest (33.3 %), when considering all the plant organs analyzed (Table 1), and corresponds to two of the five plants sampled (Table 2). Importantly, the symptom of overdevelopment associated with the disease was not found in any of the roots (Mauricio-Castillo et al., 2015), although Christensen et al. (2004) had already indicated the low concentration of phytoplasma in

incluyeron tres muestras de hojas maduras debido al alto grado de senescencia en dicho estrato en el resto de las plantas.

La presencia de CPT fue detectada en siete de 10 muestras de tallo analizadas provenientes de cinco plantas (Cuadro 1); las muestras positivas provenían de tres plantas. En general, los tallos de plantas de chile con YG no muestran síntomas ostensibles asociados con la enfermedad, aunque con cierta frecuencia se observa un mayor número de rebrotes a lo largo del tallo en este tipo de plantas; estos rebrotes pudieran ser atribuidos al desbalance hormonal provocado por este tipo de patógenos (Dermastia, 2019).

El porcentaje de detección de CPT en las muestras de frutos de chile fue de 80.0 % (Cuadro 1); sin embargo, tres de los ocho frutos positivos provenían de las primeras floraciones y el resto de las floraciones más recientes al momento del muestreo; ello podría indicar la posible inoculación temprana de estas plantas que eventualmente conduciría a una mayor distribución del patógeno en la planta.

Todas las muestras de YG provenientes de tres plantas resultaron positivas a CPT (Cuadro 1). Las YG, flores modificadas, podrían ser tejidos de crecimiento rápido donde se acumulan los nutrientes y el patógeno conducidos por el floema; ello explicaría el gran porcentaje de detección, aunque es necesario señalar que, en las otras dos plantas positivas, las YG analizadas resultaron negativas a CPT, lo cual podría indicar que la expresión de YG no siempre se encuentra asociada con la presencia de CPT o bien que la concentración del patógeno es tan reducida que es no detectable.

La raíz ha sido señalada como uno de los órganos donde la concentración de fitoplasmas tiende a ser más grande, según lo consignan Carminati et al. (2021)

Table 2. Presence of “*Candidatus Phytoplasma trifolii*” in organs of Mirasol type chili plants for drying with large bud symptoms.
Cuadro 2. Presencia de “*Candidatus Phytoplasma trifolii*” en órganos de plantas de chile para secado tipo Mirasol con síntomas de yema grande.

Organ	Plant /Planta				
	1	2	3	4	5
Root /Raíz	Positive /Positiva	Negative /Negativa	Positive /Positiva	Negative /Negativa	Negative /Negativa
Stem /Tallo	Positive /Positiva	Negative /Negativa	Positive /Positiva	Negative /Negativa	Positive /Positiva
Lower leaves / Hojas inferiores	Positive /Positiva	Negative /Negativa	Negative /Negativa	Negative /Negativa	Positive /Positiva
Upper leaves / Hojas superiores	Positive /Positiva	Negative /Negativa	Positive /Positiva	Positive /Positiva	Positive /Positiva
Apparently healthy fruits / Frutos aparentemente sanos	Positive /Positiva	Positive /Positiva	Positive /Positiva	Negative /Negativa	Negative /Negativa
Symptomatic fruits / Frutos sintomáticos	Positive /Positiva	Positive /Positiva	Positive /Positiva	Negative /Negativa	Negative /Negativa
Big bud /Yema grande	Negative /Negativa	Positive /Positiva	Negative /Negativa	Positive /Positiva	Positive /Positiva

roots of *E. pulcherrima* and sesame (*Sesamum indicum* L.) plants (Sigh et al., 2018). In strawberry (*Fragaria* spp) plants infected with clover phyllody phytoplasma, this pathogen was not detected in roots, but in large concentrations in petioles and receptacles (fruit), and smaller concentrations in sepals, petals and leaves (Clark et al., 1983).

The pathogen was also detected in the stem of three of the five plants; coincidentally, two of the plants with positive roots were also positive in the stem; the other plant that was positive in the steam did not show this characteristic in the root (Table 2). In the study by Christensen et al. (2004), the stems of *E. pulcherrima* plants were positive for CPs but the concentration of the pathogen was moderate.

Samples of lower and mature leaves were positive for CPT in two of the five plants. Usually, the leaves in this stratum are often asymptomatic, that is, they do not show marginal chlorosis, reduced size, or deformation as occurs in younger leaves in BB plants. In contrast, the youngest leaves, which showed the previously described symptoms, were positive in four of the five plants processed (Table 2); this is in agreement with Carminati et al. (2021) as the initial colonization of young leaf tissues of tomato plants by CPs and with Saracco et al. (2006) because they detected higher concentration of chrysanthemum yellow phytoplasma in young apical leaves than in basal leaves. In contrast, Christensen et al. (2004) mentioned that the presence of phytoplasma was very low or undetectable in young leaves, and their concentration was high in mature leaves of *E. pulcherrima*.

Under field conditions, some chili plants with BB symptoms develop fruits, especially in the first

y Ebadi et al. (2020) en plantas de tomate infectadas mediante injerto con *Candidatus Phytoplasma solani* (CPs) y con *Candidatus Phytoplasma australasiae*. En el presente trabajo, el porcentaje de detección en las raíces fue el menor (33.3 %), al considerar todos los órganos de la planta analizados (Cuadro 1), y corresponde a dos de las cinco plantas muestreadas (Cuadro 2). Algo importante es que, en ninguna de las raíces se encontró el síntoma de desarrollo excesivo asociado con la enfermedad (Mauricio-Castillo et al., 2015), aunque Christensen et al. (2004) ya habían indicado la concentración escasa de fitoplasmas en raíces de plantas de *E. pulcherrima* y de ajonjolí (*Sesamum indicum* L.) (Singh et al., 2018). En plantas de fresa (*Fragaria* spp) infectadas con el fitoplasma de la filodia del trébol, ese patógeno no se detectó en raíces, pero sí en concentraciones grandes en pecíolos y receptáculos (fruto), y menores en sépalos, pétalos y hojas (Clark et al., 1983).

El patógeno también fue detectado en el tallo de tres de las cinco plantas; coincidentemente, dos de las plantas con raíces positivas también fueron positivas en tallo; la otra planta que resultó positiva en tallo no presentó esa característica en raíz (Cuadro 2). En el estudio de Christensen et al. (2004), los tallos de plantas de *E. pulcherrima* resultaron positivos a CPs pero la concentración del patógeno fue moderada.

Las muestras de hojas inferiores o maduras fueron positivas a CPT en dos de las cinco plantas. Usualmente, las hojas en este estrato suelen ser asintomáticas, es decir, no muestran clorosis marginal, tamaño reducido o deformación como ocurre en las hojas más jóvenes en plantas con YG. Por el contrario, las hojas más jóvenes, que mostraron los síntomas previamente descritos, resultaron positivas en cuatro de las cinco plantas

and second branching, with an apparently healthy appearance and acceptable commercial quality. It is possible that the first and second flowering escapes infection. In this work, four of the five plants sampled had this type of fruits. CPT was detected in apparently healthy fruit from three of these four plants. Younger, but deform and smaller fruits for the same four plants were also positive for the pathogen (Table 2).

The typical symptoms of the disease is overdevelopment of the sepals or large bud (phyllody) and subsequent necrosis of the floral structure; this would imply the presence of detectable concentrations of CPT, although all field-collected plants showed large bud, the phytoplasma was only detected in the BB of three of the five plants that were positive for the pathogen (Table 2). However, all large buds obtained from the three plants were positive to CPT (Table 1). A previous study (Arredondo-Pérez et al., 2013) reported a 43.5 % detection rate of phytoplasmas in BB from chili plants of Mirasol and Ancho types. A possible explanation for the absence or non-detection of phytoplasmas in the BB of two of the plants is provided by a study conducted by MacLean et al. (2011); they noted the presence of and effector (SAP54) produced by the “witches broom” strain of Aster yellow phytoplasma that alters floral development in *Arabidopsis* plants and induces the formation of leaf structures in the flower.

In this study, seven organs or strata (root, stem, lower leaves, upper leaves, apparently healthy fruits and large buds) were analyzed for phytoplasma in the five CPT-positive chili plants. The number of phytoplasma-positive organs or strata per plant ranged from two to six (Table 2); therefore, identification of a trend was possible, especially because plants under field conditions could be infected at different stages of development and it was difficult to know or locate site or sites of inoculation by its vector, *N. tenellus*.

Other factors that may influence the concentration of the pathogen and, consequently, its detection, are the time of year when sampling was carried out and the environmental conditions. Regarding the effect of temperature and CO₂ concentration on the multiplication of *Chrysanthemum* yellow phytoplasma (CY) transmitted by *Eusceidus variegatus* Kirschbaum in *Chrysanthemum carinatum* Schousboe (chrysanthemum) and the phytoplasma “Flavescence dorée” (FD) transmitted by *Scaphoideus titanus* Ball in *Vicia faba* (L.) (fava bean), Galetto et al. (2011) noted that, in insects, phytoplasma multiplication was faster under temperate temperature conditions (18 – 22 °C and 400 ppm CO₂), and that in contrast, in host, multiplication was higher at 22 – 26 °C and 800 ppm CO₂. In the case of CY, temperature and CO₂ had an effect only on the vector *E. variegatus*. These results agree with those of Maggi et

procesadas (Cuadro 2); esto concuerda con Carminati et al. (2021) ya que la colonización inicial de tejidos foliares jóvenes de plantas de jitomate por CPs y con Saracco et al. (2006) porque ellos detectaron mayor concentración del fitoplasma del amarillamiento del crisantemo en las hojas jóvenes apicales que en las hojas basales. En contraste, Christensen et al. (2004) mencionaron que la presencia de fitoplasmas fue muy reducida o no detectable en hojas jóvenes, y su concentración fue grande en hojas maduras de *E. pulcherrima*.

En condiciones de campo, algunas plantas de Chile con síntomas de YG llegan a desarrollar frutos, especialmente en la primera y segunda ramificación, con un aspecto aparentemente sano y una calidad comercial aceptable. Lo posible es que la primera y segunda floración escapen a la infección. En este trabajo, cuatro de las cinco plantas muestreadas poseían este tipo de frutos. CPT fue detectado en frutos aparentemente sanos de tres de esas cuatro plantas. Frutos más jóvenes, pero deformes y de menor tamaño provenientes de las mismas cuatro plantas anteriores, también fueron positivos al patógeno (Cuadro 2).

El síntoma típico de la enfermedad es el sobredesarrollo de los sépalos o yema grande (filodia) y la posterior necrosis de la estructura floral; ello supondría la presencia de concentraciones detectables de CPT; aunque todas las plantas recolectadas en campo mostraban yemas grandes, el fitoplasma solo fue detectado en las YG de tres de las cinco plantas que fueron positivas al patógeno (Cuadro 2). No obstante, todas las yemas grandes obtenidas en las tres plantas resultaron positivas a CPT (Cuadro 1). En un estudio previo (Arredondo-Pérez et al., 2013) se consigna un 43.5 % de detección de fitoplasmas en YG provenientes de plantas de Chile de los tipos Mirasol y Ancho. Una explicación posible de la ausencia o no detección de fitoplasmas en las YG de dos de las plantas es provista por un estudio realizado por MacLean et al. (2011); ellos señalaron la presencia de un efector (SAP54) producido por la cepa “escoba de bruja” del fitoplasma del amarillamiento del Áster que altera el desarrollo floral en plantas de *Arabidopsis* e induce la formación de estructuras foliares en la flor.

En este estudio, en las cinco plantas de Chile positivas a CPT se analizaron siete órganos o estratos para la detección del fitoplasma (raíz, tallo, hojas inferiores, hojas superiores, frutos aparentemente sanos, frutos sintomáticos y yemas grandes). El número de órganos o estratos positivos a fitoplasma por planta varió entre dos y seis (Cuadro 2); por lo tanto, la identificación de una tendencia fue imposible, especialmente porque las plantas en condiciones de campo pudieron ser infectadas en diferentes etapas de desarrollo y resultó

al. (2014) who mentioned that the epidemic spread rate of *Candidatus Phytoplasma asteris*, in *Chrysanthemum carinatum* Schousb, associated with the leafhopper *Macrosteles quadripunctulatus* Kirschbaum, was 0.2 infected plants per day at 15 °C and 0.7 plants per day at 30 °C. This spread is attributed to a faster multiplication of the phytoplasma in host plants and to a higher feeding frequency of the vector. In symptomless Mexican lemon trees *Citrus aurantifolia* (Christm.), the concentration of '*Candidatus Phytoplasma aurantifolia*' was higher in August (35 °C) compared to March (24 °C) and December (21 °C); therefore, the higher concentration of phytoplasma may be associated with the increase of temperature in summer (Mazraie et al., 2019). The sampling of chili plants in the present study was conducted in September 2022, when the temperature in the highlands of Zacatecas begins to decrease and probably influenced the concentration of the pathogen.

This same situation, the null detection in CPT-infected plants, in all plant organs, was evidenced in the different fruit tissues. Of the seven fruits selected from a CPT-positive plant in leaves and LB, and sectioned to detect the phytoplasma in various of its tissues (peduncle, pericarp, seed and placenta), it was found that in at least one of these tissues, the presence of a 1250 pb fragment was confirmed in both the extracts analyzed and in the positive control. Some amplification in the negative control (sterile water) was not observed, as shown in Figure 2, which shows the nested PCR results of these samples. In none of the seven fruits analyzed was CPT detected in all tissues involved (peduncle, pericarp, placenta and seed); only in three of these fruits the infected tissues were peduncle, pericarp and placenta; in their seed, the pathogen was not detected (Table 3).

The placenta was the tissue with the highest percentage of CPT detection (71.4 %), followed by the peduncle and pericarp (57.1 % in both cases); the seed had the lowest percentage (28.5 %) of pathogen detection (Table 3). An important aspect was the confirmation of the presence of CPT in the different parts of the seed, as well as its ability to survive the germination process. The transmission of another bacterium, *Candidatus Liberibacter solanacearum* (Ca. L.s) by the vector *Bactericera cockerelli*, by grafting and, especially, via the seed, has been reported in chili crop (Camacho et al., 2011). Also, transmission of this same pathogen, Ca. L.s., via carrot seed has been reported (Bertolini et al., 2015).

The current work was carried out under field conditions in a commercial field of Mirasol type chili for drying; therefore, CPT infection was expressed naturally, that is, there was no vector control and each plant sampled represented a special case. This

difícil conocer o localizar el sitio o sitios de inoculación por su vector, *N. tenellus*.

Otros factores que pueden influir en la concentración del patógeno y, consecuentemente, en su detección, son la época de año en que se realizó el muestreo y las condiciones ambientales. En relación con el efecto de la temperatura y la concentración de CO₂ en la multiplicación del Fitoplasma amarillo del crisantemo (CY) transmitido por *Euscelidius variegatus* Kirschbaum en *Chrysanthemum carinatum* Schousboe (crisantemo) y el fitoplasma "Flavescence dorée o Flavescencia dorada" (FD) transmitido por *Scaphoideus titanus* Ball en *Vicia faba* (L.) (haba), Galetto et al. (2011) señalaron que, en los insectos, la multiplicación de los fitoplasmas fue más rápida en condiciones de temperaturas templadas (18-22 °C y 400 ppm CO₂), y que en contraste, en los hospederos, la multiplicación fue mayor a 22-26 °C y 800 ppm de CO₂. En el caso de CY, la temperatura y el CO₂ tuvieron efecto solamente sobre el vector *E. variegatus*. Estos resultados concuerdan con los de Maggi et al. (2014) quienes mencionan que la tasa de propagación de la epidemia de *Candidatus Phytoplasma asteris*, en *Chrysanthemum carinatum* Schousb, asociada al cicadelido *Macrosteles quadripunctulatus* Kirschbaum, fue de 0.2 plantas infectadas por día a 15 °C y de 0.7 plantas por día a 30 °C. Esa propagación se atribuye a una multiplicación más rápida del fitoplasma en las plantas hospederas y a una mayor frecuencia de alimentación del vector. En árboles de limón mexicano *Citrus aurantifolia* (Christm.) sin síntomas, la concentración de '*Candidatus Phytoplasma aurantifolia*' fue mayor en agosto (35 °C) en comparación con marzo (24 °C) y diciembre (21 °C); por lo tanto, la mayor concentración del fitoplasma puede asociarse al incremento de la temperatura en verano (Mazraie et al., 2019). El muestreo de plantas de chile en el presente estudio se realizó en septiembre de 2022, cuando la temperatura en el altiplano de Zacatecas principia a descender y probablemente influyó sobre la concentración del patógeno.

Esta misma situación, la nula detección en plantas infectadas con CPT, en todos los órganos de la planta, se evidenció en los diferentes tejidos de los frutos. De los siete frutos seleccionados de una planta positiva a CPT en hojas y YG, y seccionados para detectar al fitoplasma en varios de sus tejidos (pedúnculo, pericarpio, semilla y placenta), se encontró que, en por lo menos en uno de esos tejidos, se confirmó la presencia de un fragmento de 1250 pb tanto en los extractos analizados como en el control positivo. Alguna amplificación en el control negativo (agua estéril) no fue observada, según se aprecia en la Figura 2 que muestra el resultado de la PCR anidada de estas muestras. En ninguno de los siete frutos analizados se detectó la presencia de CPT en todos los tejidos involucrados (pedúnculo, pericarpio,

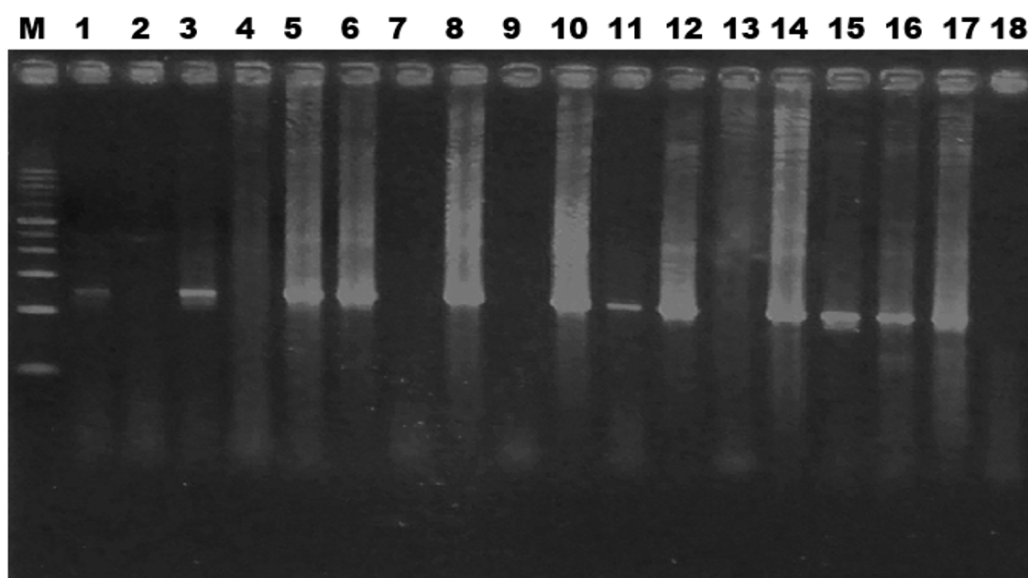


Figure 2. 1.2 % agarose gel electrophoresis showing nested PCR products obtained from Mirasol type chili fruit extracts using P1/Tint6 and R16F2n/R16R2 oligonucleotides pairs. Lane M, 1 kb plus DNA molecular weight (Invitrogen Life Technologies); lane 1, seed; lane 2, pericarp; lane 3, seed; lane 4, peduncle; lane 5, placenta; lane 6, peduncle; lane 7, peduncle; lane 8, placenta; lane 9, pericarp; lane 10, pericarp; lane 11, peduncle; lane 12, placenta; lane 13, peduncle; lane 14, placenta; lane 15, placenta; lane 16, complete fruit; lane 17, positive control and lane 18, negative control.

Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2 % que muestra los productos del PCR anidado obtenidos a partir de los extractos de frutos de chile tipo Mirasol mediante el uso de los pares de oligonucleótidos P1/Tint6 y R16F2n/R16R2. Carril M, marcador de peso molecular de 1 kb plus DNA (Invitrogen Life Technologies); carril 1, semilla; carril 2, pericarpio; carril 3, semilla; carril 4, pedúnculo; carril 5, placenta; carril 6, pedúnculo; carril 7, pedúnculo; carril 8, placenta; carril 9, pericarpio; carril 10, pericarpio; carril 11, pedúnculo; carril 12, placenta; carril 13, pedúnculo; carril 14, placenta; carril 15, placenta; carril 16, fruto completo; carril 17, control positivo y carril 18, control negativo.

Table 3. Chili fruit tissues for drying Mirasol type positive for the presence of *Candidatus Phytoplasma trifolii*.

Cuadro 3. Tejidos de frutos de chile para secado tipo Mirasol positivos a la presencia de *Candidatus Phytoplasma trifolii*.

Fruit / Fruto	Tissue / Tejido			
	Peduncle / Pedúnculo	Pericarp / Pericarpio	Placenta / Placenta	Seed / Semilla
1	Negative / Negativa	Positive / Positiva	Negative / Negativa	Positive / Positiva
2	Positive / Positiva	Negative / Negativa	Positive / Positiva	Positive / Positiva
3	Positive / Positiva	Positive / Positiva	Positive / Positiva	Negative / Negativa
4	Negative / Negativa	Positive / Positiva	Negative / Negativa	Negative / Negativa
5	Positive / Positiva	Positive / Positiva	Positive / Positiva	Negative / Negativa
6	Positive / Positiva	Negative / Negativa	Positive / Positiva	Negative / Negativa
7	Negative / Negativa	Negative / Negativa	Positive / Positiva	Negative / Negativa
Detection (%) / Detección (%)	(4/7): 57.1	(4/7): 57.1	(5/7): 71.4	(2/7): 28.5

makes it difficult to identify a pattern or trend in the dissemination of the pathogen through the plant organs; however, the results obtained allow us to establish that most of the organs of Mirasol type chili plants are irregularly colonized by CPT. Of particular importance for understanding the survival and dissemination of the pathogen is its detection in the peduncle, pericarp, placenta and seeds of apparently healthy and symptomatic fruits collected from BB plants. Therefore, there is still a latent lack of precise information on the exact situation of the phytoplasma in the seed and the effect on its germination capacity that clarifies its participation in the disease cycle.

Conclusions

The presence of *Candidatus Phytoplasma trifolii* was detected in root, stem, leaves, fruits and large buds of Mirasol type chili plants for drying. In big buds, fruit, stems and leaves, mainly in the upper ones, the highest percentages of detection were observed. In chili fruits from CPT-positive plants, the pathogen was detected in peduncle, pericarp, placenta and seeds.

No consistent pattern or trend of phytoplasma distribution within the plants and fruits was discernible.

End of English version

References / Referencias

- Arredondo-Pérez, A., Reveles-Torres, L. R. & Velásquez-Valle, R. (2013). Presencia de fitoplasmas asociados al síntoma de "yema grande" en chile para secado en Zacatecas, México. *Agrofaz* 13 (3):61-69.
- Bertolini, E., Teresani, G. R., Loiseau, M., Tanaka, F. A. O., Barbé, S., Martínez, C., Gentit, P., Lopez, M. M. & Cambra, M. (2015). Transmission of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' in carrot seeds. *Plant Pathology* 64(2):276-285.
- Camacho-Tapia, M., Rojas-Martínez, R. I., Zavaleta-Mejía, E., Hernández-Dehesa, M. G., Carrillo-Salazar, J. A., Rebollar-Alviter, A. & Ochoa-Martínez, D. I. (2011). Aetiology of chili pepper variegation from Yurecuaro, Mexico. *Journal of Plant Pathology* 93 (2):331-335.
- Carminati, G., Brusa, V., Loschi, A., Ermacora, P. & Martini, M. (2021). Spatiotemporal and quantitative monitoring of the fate of "*Candidatus Phytoplasma solani*" in tomato plants infected by grafting. *Pathogens* 2021, 10, 811. <https://doi.org/10.3390/pathogens10070811>
- Çarpar, H. & Sertkaya, G. (2022). Investigation on phytoplasma diseases, their potential insect vectors and other hosts in pepper (*Capsicum annum* L.) growing areas of Hatay-Turkey. *Mustafa Kemal University Journal of Agricultural Sciences* 27(2):241-252.

placenta y semilla); solamente en tres de los siete frutos (Frutos 2, 3, y 5) se detectó la presencia del patógeno; en dos de esos frutos, los tejidos infectados fueron pedúnculo, pericarpio y placenta; en su semilla no se detectó al patógeno (Cuadro 3).

La placenta fue el tejido con el mayor porcentaje de detección de CPT (71.4 %), seguido por el pedúnculo y el pericarpio (57.1 % en ambos casos); a la semilla correspondió el menor porcentaje (28.5 %) de detección del patógeno (Cuadro 3). Algo importante fue la confirmación de la presencia de CPT en las diferentes partes de la semilla, así como su habilidad para sobrevivir al proceso de germinación. En el cultivo de chile se reporta la transmisión de otra bacteria, *Candidatus Liberibacter solanacearum* (Ca. L.s.) por el vector *Bactericera cockerelli*, por injerto y, especialmente, vía la semilla (Camacho et al., 2011). También, la transmisión de este mismo patógeno, Ca.L.s., por medio de la semilla de zanahoria se ha señalado (Bertolini et al., 2015).

El trabajo actual se realizó en condiciones de campo en una parcela comercial de chile para secado del tipo Mirasol; por lo tanto, la infección por CPT se expresó de manera natural, es decir, no se tuvo control del vector y cada planta muestreada representó un caso especial. Lo anterior dificulta la identificación de un patrón o tendencia en la disseminación del patógeno a través de los órganos de la planta; sin embargo, los resultados obtenidos permiten establecer que la mayoría de los órganos de las plantas de chile tipo Mirasol son colonizados de forma irregular por CPT. De particular importancia para entender la supervivencia y disseminación del patógeno resulta su detección en el pedúnculo, pericarpio, placenta y semillas de frutos aparentemente sanos y sintomáticos recolectados en plantas con YG. Entonces, aun es latente la carencia de información precisa sobre la situación exacta del fitoplasma en la semilla y el efecto sobre su capacidad de germinación que aclare su participación en el ciclo de la enfermedad.

Conclusiones

La presencia de *Candidatus Phytoplasma trifolii* en raíz, tallo, hojas, frutos y yemas grandes de plantas de chile para secado tipo Mirasol fue detectada. En yemas grandes, fruto, tallos y hojas, principalmente en las superiores, se apreciaron los porcentajes mayores de detección. En frutos de chile provenientes de plantas positivas a CPT se detectó al patógeno en pedúnculo, pericarpio, placenta y semillas.

Algún patrón o tendencia de distribución consistente del fitoplasma dentro de plantas y frutos no fue apreciable.

Fin de la versión en español

- Christensen, N. M., Nicolaisen, M., Hansen, M. & Achulz, A. (2004). Distribution of phytoplasmas in infected plants as revealed by real-time PCR and bioimaging. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17(11):1175-1184.
- Clark, M. F., Barbara, D. J. & Davies, D. L. (1983). Production and characteristics of antisera to *Spiroplasma citri* and clover phyllody-associated antigens derived from plants. *Annals of Applied Biology* 103(2):251-259.
- Dermastia, M. (2019). Plant Hormones in phytoplasma infected plants. *Frontiers in Plant Science*. 10:477. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00477>
- Ebadi, N., Najafipoui, G., Faghihi, M. M. & Ayazpour, K. (2020). Determination of distribution pattern of *Candidatus Phytoplasma australasiae* in tomato plants as revealed by Real-time PCR. *Journal of Microbial World* 12(4):377-392.
- Faghigi, M. M., Taghavi, S. M., Safaei, A., Siampour, M. Najafabadi Modarres, S. S. (2016). First report of a phytoplasma associated with bell pepper big bud disease in Iran. *New Disease Reports* (2016) 33, 15. <https://doi.org/10.5197/j.2044-0588-2016-033.015>
- Firrao, G., García-Chapa, M. Marzachi, C. (2007). Phytoplasmas: Genetics, Diagnosis and Relationships with the Plant and Insect Host. *Frontiers in Bioscience* 12:1353-1375. <https://doi.org/10.2741/2153>
- Galetto, L., Marzachi, C., Marques, R., Graziano, C. & Bosco, D. (2011). Effects of temperature and CO₂ on phytoplasma multiplication pattern in vector and plant. *Bulletin of Insectology*. 64 (Supplement):S151-S152
- Gundersen, D. & Lee, I. (1996). Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathologia Mediterranea* 35(3):144-151.
- MacLean, A. M., Sugio, A., Makarova, O. V., Findlay, K. C., Grieve, V. M., Tóth, R., Nicolaisen, M. & Hogenhout, S. A. (2011). Phytoplasma effector SAP54 induces indeterminate leaf-like flower development in Arabidopsis plants. *Plant Physiology* 157(2):831-841.
- Maggi, F., Galetto, L., Marzachi, C. & Bosco, D. (2014). Temperature-dependent transmission of *Candidatus Phytoplasma asteris* by the vector leafhopper *Macrostelus quadripunctulatus* Kirschbaum. *Entomologia*. 2(2):87-94. <https://doi.org/10.408/entomología.2014.202>
- Mauricio-Castillo, J. A., Salas-Muñoz, S., Velásquez-Valle, R., Ambriz-Granados, S. & Reveles-Torres, L. R. (2015). '*Candidatus Phytoplasma trifolii*' (16SrVI) en Chile mirasol (*Capsicum annuum* L.) cultivado en Zacatecas, México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 38(4):389-396.
- Mazraie, M. A., Izadpanah, K., Hamzehzarghani, H. & Fagihini, M. (2019). Spread and colonization pattern of '*Candidatus Phytoplasma aurantifolia*' in lime plants [*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle] as revealed by real-time PCR assay. *Journal of Plant Pathology*. 101:629-637. <https://doi.org/10.1007/s42161-019-00251-4>
- Randall, J. J., Bosland, P. W. & Hanson, S. F. (2009). Broto grande, a new phytoplasma-associated disease of Chile peppers. *Plant Disease* 93(9):968.
- Randall, J. J., Bosland, P. W. & Hanson, S. F. (2011). Broto grande, a new phytoplasma associated disease of Chile peppers in the Desert Southwest. Online. *Plant Health Progress*. <http://doi.org/10.1095/PHP-2011-0301-01-RS>
- Saracco, P., Bosco, D., Veratti, F. & Marzachi, C. (2006). Quantification over time of chrysanthemum yellow phytoplasma (16Sr-I) in leaves and root of the host plant *Chrysanthemum carinatum* (Schousboe) following inoculation with its insect vector. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 67:212-219. <https://doi.org/10.1016/j.pmp.2006.02.001>
- Singh, V., Kumar, S. & Lakhanpaul, S. (2018). Differential distribution of phytoplasma during phyllody progression in sesame (*Sesamum indicum* L.) under field conditions – An important consideration for effective sampling of diseased tissue. *Crop Protection* 110:288-294. <http://doi.org/10.1016/j.cropro.2017.01.016>
- Smart, C. D., Schneider, B., Blomquist, C. L., Guerra, L. J., Harrison, N. A., Ahrens, U., Lorenz, K. H., Seemuller, E. & Kirkpatrick, B. C. (1996). Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of the 16S-23S rRNA spacer region. *Applied and Environmental Microbiology* 62(8):2988-2993.
- Zibadoost, S., Rastgou, M. & Tazehkand, S. A. (2016). Detection and molecular identification of '*Candidatus phytoplasma trifolii*' infecting some cultivated crops and vegetables in West Azarbaijan province, Iran. *Australian Plant Disease Notes* 11:3. <http://doi.org/10.1007/s13314-015-0188-8>