

FITOPLASMAS: SÍNTOMAS Y CARACTERÍSTICAS MOLECULARES

G. Camarena Gutiérrez; R. De La Torre Almaraz

Unidad de Morfología y Función; FES Iztacala. UNAM.
Av. De los Barrios Núm. 1, Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla C. P. 54090 México

RESUMEN

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

PALABRAS CLAVE: organismos parecidos a micoplasmas, Mollicutes, insecto vector, filogenia, 'Candidatus'.

PHYTOPLASM: SYMPTOM AND MOLECULAR CHARACTERISTICS

SUMMARY

Phytoplasms are plant-pathogenic they usually inhabit phloem sieve tubes and are transmitted from plant to plant by phloem-feeding insects. Phytoplasms, formerly called mycoplasma-like organisms, are associated with diseases in several hundred plant species. The use of molecular probes, phytoplasma-specific cloned DNA and monoclonal antibodies have made it possible to classify phytoplasms on the basis of DNA-DNA homology and serological data. Recent investigations, particularly sequence analysis of 16S rDNA, have revealed that phytoplasms constitute a coherent, genus-level taxon. In the monophyletic phytoplasma clade, groups and subgroups have been delineated, many of which are being considered as putative species under the provisional status 'Candidatus' for incompletely described prokaryotes

KEY WORDS: mycoplasma-like organisms, Mollicutes, insect vector, phylogeny, 'Candidatus'.

INTRODUCCIÓN

Históricamente en la patología de plantas, como en la medicina animal, no sólo los patógenos sino también las enfermedades que causan se han nombrado teniendo como base a los síntomas mostrados por los hospederos infectados. Las enfermedades de las plantas atribuidas a los fitoplasmas no son la excepción a esta práctica. Por ejemplo, muchas enfermedades producidas por fitoplasmas, han sido clasificadas en términos generales, ya sea como enfermedades de declinación o de virescencia. Nombres de enfermedades como la declinación de la pera, amarillamiento letal de la palma, y otros, indica la importancia de la percepción de los síntomas en la asignación de los nombres comunes de las enfermedades. A su vez los nombres comunes de los patógenos se derivan de los nombres de

las enfermedades de las plantas a las que son asociados. Haciendo una generalización se asume que cada enfermedad es causada por una sola especie de fitoplasma. Sin embargo, la investigación ha dejado en claro que diferentes fitoplasmas pueden causar síntomas aparentemente idénticos en ciertas plantas. Por otro lado, algunos fitoplasmas estrechamente relacionados pueden causar síntomas claramente diferentes en las plantas hospedantes. Además una enfermedad puede ser producida por diferentes fitoplasmas en diferentes regiones geográficas.

Cuando se encuentra una planta enferma, se tiende a ver el síndrome como la indicación de una enfermedad particular. Algunos síndromes inducidos por fitoplasmas específicos pueden estar suficientemente caracterizados para confiar en que los síntomas, o bien en la microscopia,

son suficientes para el diagnóstico práctico. El diagnóstico de la enfermedad con base en los síntomas o la microscopía en circunstancias inapropiadas puede llevar a un diagnóstico erróneo y, subsecuentemente, a realizar esfuerzos equivocados en el manejo de la enfermedad. El diagnóstico preciso requiere la identificación del patógeno para el control efectivo de la enfermedad. Los fitoplasmas causan síndromes similares y se transmiten ampliamente por diferentes vectores, así que el control efectivo de la enfermedad puede requerir la intervención en el ciclo de vida del vector. La identificación precisa del patógeno, es necesaria en casos de diferentes síndromes causados por fitoplasmas relacionados. Por ejemplo, diferentes cepas clasificadas en el grupo I de fitoplasmas (16S rRNA grupo I) pueden causar síntomas idénticos o diferentes en la misma especie de hospedante, dependiendo de la cepa elegida para comparación. La comprensión de las relaciones entre las propiedades biológicas y la clasificación basada en las secuencias conservadas requiere de estudios amplios del genoma de los fitoplasmas. En esta revisión se describen de manera breve las principales enfermedades que producen así como las características moleculares de estos procariontes, que les permiten clasificarse dentro de la clase Mollicutes.

Características específicas de los fitoplasmas

Son parásitos estrictos del hábitat intracelular de plantas e insectos vectores. Su tamaño y crecimiento depende del grado de desarrollo de los tubos cribosos donde se localizan, y tienen la capacidad de pasar lentamente a través de los poros de las células cribosas del floema. La célula del fitoplasma está rodeada por una membrana plasmática trilaminar, de unos 10 nm de grosor, compuesta, al igual que en el resto de procariontes, de dos tercios de proteínas y un tercio de lípidos. Su citoplasma contiene ribosomas para la síntesis de proteínas, y una molécula de ADN doble circular. Se ha detectado también la presencia de ADN extracromosómico (Nishigawa *et al.*, 2001).

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

Insectos vectores de fitoplasmas

Los fitoplasmas, como parásitos estrictos, sólo viven en las plantas y en sus insectos vectores. Los fitoplasmas se transmiten a través de insectos vectores pertenecientes al orden Homoptera, Familias Cicadellidae, Cixidae, Cercopidae, Psyllidae y Fulgoridae, se multiplican en el inte-

rior del insecto y persisten en él hasta su muerte. Aunque normalmente no se transmiten a la descendencia, se ha podido demostrar la transmisión vertical de los fitoplasmas FD y SWLP en los vectores *Scaphoideus titanus* Ball (Alma *et al.*, 1997) y *Matsumuratettix hiroglyphicus* Matsumura (Hanboonson *et al.*, 2002).

Los fitoplasmas se pueden transmitir por uno o varios vectores, dependiendo del grado de especificidad en la interacción fitoplasma-insecto. Existen fitoplasmas con baja especificidad por el vector, como la Enfermedad X del melocotonero, CP o AY a los que se les conocen varias especies de insectos transmisores de la enfermedad. En cambio, otros fitoplasmas sólo se transmiten por un vector, como es el caso del fitoplasma FD de la vid, transmitido únicamente por el cicadélido *Scaphoideus titanus* Ball (Alma *et al.*, 1997). El rango de plantas hospederas para cada fitoplasma depende del comportamiento alimenticio de vector. Vectores monófagos u oligófagos, diseminan el fitoplasma entre una o pocas especies vegetales, como es el caso de *Cacopsylla pyri* y el fitoplasma PD. En cambio, si el insecto se alimenta de diferentes especies vegetales, el fitoplasma afectará a un mayor rango de plantas, como es el caso de *Macrosteles fascifrons* que transmite el fitoplasma AAY (16Srl-A, 16Srl-B) a más de 191 especies de plantas diferentes.

Sintomatología de las plantas

En general, las enfermedades de las plantas asociadas a la presencia de estos patógenos, se reconocen por un conjunto de síntomas, que sugieren profundas alteraciones en el equilibrio hormonal de la planta; la fotosíntesis; las sustancias de reserva. Los síntomas que presentan las plantas con mayor frecuencia son:

1. Amarillamiento o clorosis.
2. Enrojecimiento precoz de las hojas.
3. Esterilidad de las flores.
4. Virescencia, donde los pétalos tienen color verde, sin desarrollo del color característico de la flor (Figura 1).
5. Enanismo generalizado.
6. Desarreglos vegetativos, como el desarrollo de grandes cúmulos de hojas o flores sin desarrollarse, acumulándose generalmente en lugar de las yemas axilares (Figura 2).
7. Enrollamiento de hojas.
8. Decaimiento general (Figura 3).
9. Filodio, cuando sucede la transformación de los órganos florales en estructuras foliares (Figura 4).

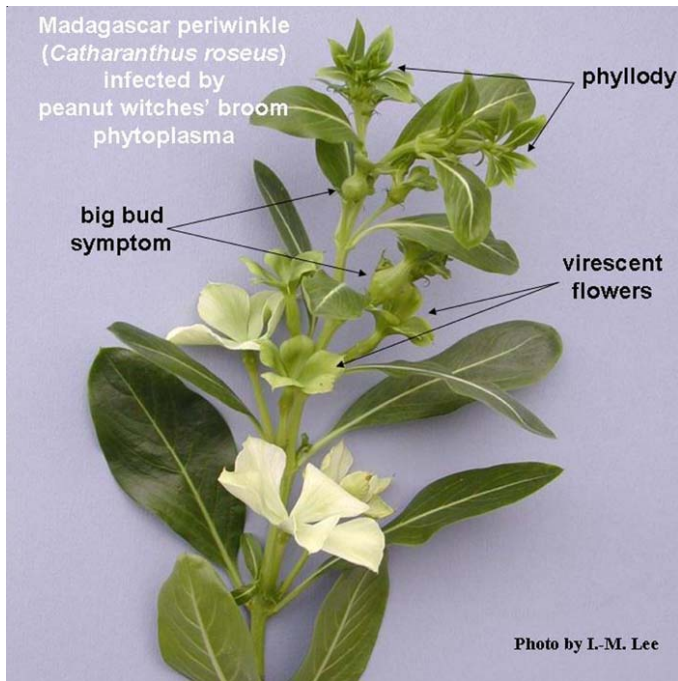


FIGURA 1. *Catharanthus roseus* infectado con fitoplasma peanut witches' broom. Las flores virescentes son de color verde, también se observa el filodio en el lugar de las flores y finalmente se indica la presencia del síntoma de yemas grandes que acumulan hojas o flores sin terminar su crecimiento. La fotografía es del Dr. I. M. Lee del mismo grupo del Dr. Davies.



FIGURA 2. *Catharanthus roseus*, infectado con fitoplasma cepa NJAY. Se muestran desarreglos del crecimiento. Hojas anormalmente pequeñas y ramificaciones excesivas.

10. Proliferación de yemas adventicias que al desarrollarse crecen muchas ramificaciones de un solo sitio, dando lugar a "escobas de bruja" (Figura 5).

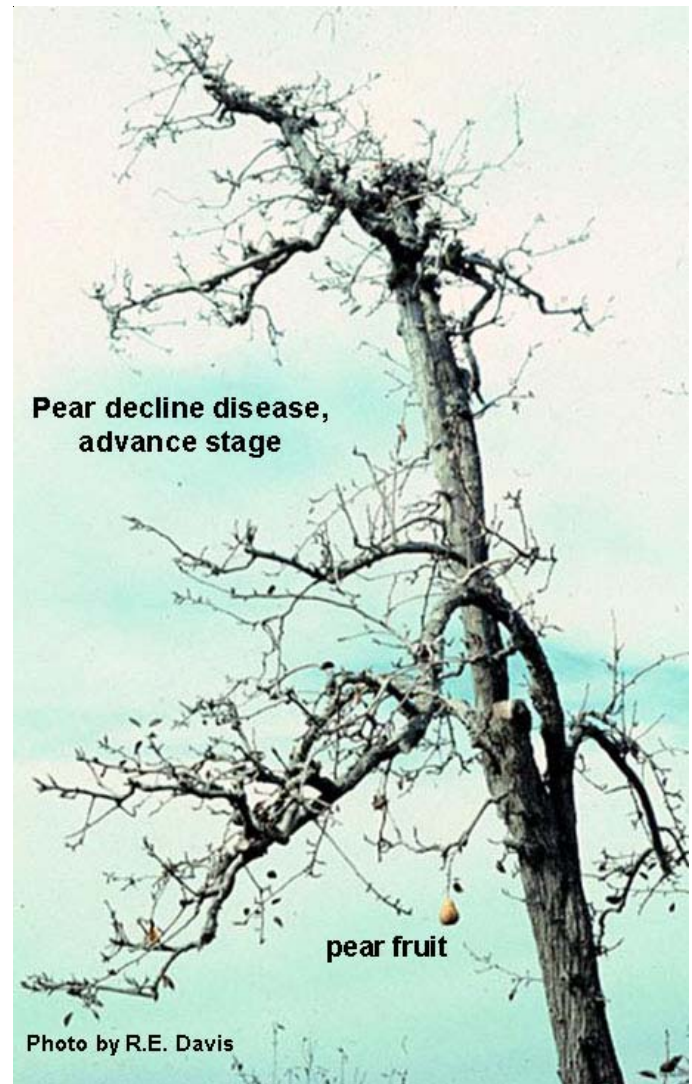


FIGURA 3. Decaimiento avanzado de la pera. Fotografía del Dr. Robert E. Davies. Se conserva la fotografía original con letreros en inglés.

Algunos de estos síntomas como la virescencia, escoba de brujas, y filodio son casi exclusivos de fitoplasmas.

Fitoplasmas y el género *Prunus*

La almendra (*Prunus amygdalus*) es un cultivo importante en países del Mediterráneo, donde se reportó una enfermedad devastadora, caracterizada por el desarrollo de "escobas de bruja" (Witches'-broom) en las que no se desarrollan flores o frutos, y el árbol muere en pocos años. Las células del fitoplasma estaban localizadas solamente en los tubos cribosos y se encontraron en los peciolo y la vena central de las hojas de árboles con síntomas, pero no en los árboles asintomáticos. Las células encontradas tenían la estructura pleomorfica (que varía en el tamaño y la forma de las células o sus núcleos) típica de los fitoplasmas, con formas predominantemente filamentosas y ramificadas de 0.1 a 0.2 micras de diámetro. Las células del fitoplasma



FIGURA 4. Filodio, cuando sucede la transformación de los órganos florales en estructuras foliares. Las fotografías pertenecen al Dr. Robert E. Davis, líder de investigación en fitoplasmas Departamento de Agricultura Edificio 004, BARC-West 10300 Baltimore Ave. Beltsville, MD. 20705.



FIGURA 5. Escobas de bruja en un roble. debtorby.typepad.com/.../nature/index.html.

estaban rodeadas por la membrana de tres capas característica de la clase Mollicutes. El fitoplasma se pudo transmitir experimentalmente a plántulas de almendros (*Prunus amygdalus*), ciruelos (*Prunus mariana*) y duraznos (*Prunus persicae*). Los síntomas se desarrollaron después de un mes, y consistieron en la proliferación de yemas axilares similares a las observadas en árboles infectados de manera natural. Como los fitoplasmas no pueden cultivarse *in vitro*, no se pueden llenar los postulados de Koch. La demostración, a través de microscopía electrónica y PCR, de la presencia de fitoplasmas solamente en árboles infectados, es un fuerte indicador que los fitoplasmas son el agente causal de esta enfermedad (Verdin *et al.*, 2003)

Nuevos lineamientos para la clasificación taxonómica

Algunas enfermedades de las plantas caracterizadas por alteraciones en el desarrollo, amarillamiento, filodio, escobas de brujas, achaparramiento y virescencia fueron atribuidas a virus. Sin embargo, cuando Doi, 1967 y su grupo de trabajo descubrieron la presencia de procariontes sin pared celular dentro de los vasos cribosos de plantas, demostraron que esas enfermedades no eran causadas por virus como se decía. En un principio, estos procariontes fueron denominados organismos parecidos a micoplasmas (MLO, micoplasma like organisms). Estos patógenos en plantas tienen una estructura parecida a los miembros de la clase Mollicutes, que reciben el nombre trivial de micoplasmas en animales.

Los miembros de la clase Mollicutes, se caracterizan por carecer de pared celular, tienen un genoma pequeño de 680 a 1,600 kb, y un bajo contenido guanina-citosina. Los estudios de Wose (1980, 1987) sugirieron que los diversos Mollicutes son derivados de un solo linaje ancestral de bacterias grampositivas. En 1994 el Comité de Taxonomía de los Mollicutes, de la Organización Internacional de la Micoplasmología (IOM por sus siglas en inglés) estableció el nombre actual de fitoplasmas (Kirkpatrick, 1994). Los estudios de Woese (1980), y otros como Olsen (1988) y Weisburg (1989) postularon que la filogenia de los procariontes podía manifestarse a través de las secuencias de genes altamente conservados que dirigen la síntesis del ARN ribosomal.

Hasta 1990, los seres vivos se clasificaban en cinco reinos. Sin embargo, mediante el estudio de los genes de RNA ribosómico, el grupo de Woese presentó un modelo filogenético que revolucionó los esquemas taxonómicos establecidos hasta el momento. Desde ese momento los seres vivos pasaron a clasificarse en tres dominios: Bacteria (o Eubacteria), Archaea y Eucarya (Woese, 1990) (Figura 6).

Probablemente el análisis de la secuencia del gen del rRNA 16 S es el método más ampliamente utilizado para la determinación de relaciones filogenéticas y para la clasificación molecular de microorganismos (Fox *et al.*, 1992). Este enfoque ha sido muy utilizado para la clasificación de microorganismos a nivel de género o rangos taxonómicos superiores, sin embargo, la secuencia del gen rRNA 16S no es muy usado para la diferenciación a nivel de especies (Stackebrandt y Goebel, 1994). Por lo que son necesarios los criterios bioquímicos o biológicos para una adecuada determinación de la especie.

El uso de sondas moleculares, DNA clonado de fitoplasmas y los anticuerpos monoclonales han hecho posible clasificar fitoplasmas (Daire, *et al.*, 1992). Sin embargo, la sensibilidad de estas sondas moleculares fue insuficiente para muchos fitoplasmas asociados con plantas leñosas, en las que las concentraciones de fitoplasmas son

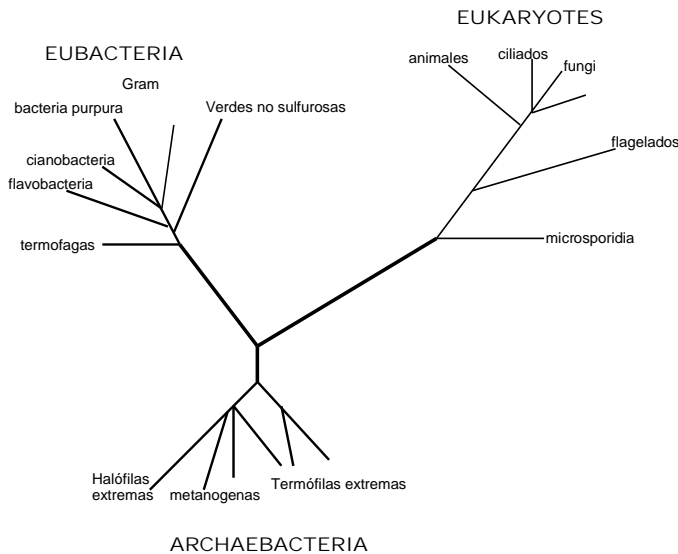


FIGURA 6. Clasificación de los seres vivos en tres dominios de acuerdo al árbol filogenético universal en base a la secuencia del rRNA. La raíz se infiere de duplicaciones de genes ancestrales (adaptado de Woese, 1990).

relativamente bajas. La utilización de la reacción en cadena de la polimerasa, acoplada a la transcriptasa inversa, RT-PCR, con base en secuencias de ARN de fitoplasmas permitió un medio más sensible para su detección (Jarauch, *et al.*, 1994). El análisis filogenético con base en el rRNA 16S ha revelado que los fitoplasmas no cultivables forman un clado monofilético grande dentro de la clase Mollicutes (Gundersen, *et al.*, 1994). Utilizando grupos específicos de fitoplasmas o utilizando primers universales, que son fragmentos de las secuencias conservadas del gen que tiene la información del ARN ribosomal 16S, se tiene actualmente un método sensible para la detección de fitoplasmas en plantas infectadas o en insectos vectores (Ahrens y Seemüller, 1992).

Justificación de la presencia de los fitoplasmas en la clase Mollicutes

A partir del año 1989 empiezan a hacerse estudios que clarifican la pertenencia de los fitoplasmas a la clase Mollicutes. Los genomas de los MLO o fitoplasmas contienen entre 25 y 32 % de G+C y tienen entre 640 y 1,185 kb, valores similares a la de los micoplasmas que ya se cultivan. Comparando las secuencias ribosómicas del 16S rDNA de los fitoplasmas pertenecientes al grupo actual de los AY, aster yellows, con otros procariontes, se demuestra que los fitoplasmas están emparentados filogenéticamente con los Mollicutes, y dentro de esta clase, sus secuencias ribosómicas tendrían homología con *Acholeplasma laidlawii*, del orden Acholeoplasmatales con otros micoplasmas como *Micoplasma capricolum*, del orden Mycoplasmatales.

Otros estudios que corroboran su parentesco con el

orden Achoplasmatal son: los fitoplasmas, al igual que *A. laidlawii*, utilizan UGA como codón de terminación, y por tanto se diferencian de *M. capricolum* del orden Mycoplasmatal. Las características de la membrana del fitoplasma AOY, cuando se cultiva en ausencia de esterol son más cercanas a *A. laidlawii*, que a la de *M. gallisepticum*.

Clasificación de los fitoplasmas

El gen 16S rDNA

Constituido por 1,500 bases, se encuentra dentro del operón ribosómico de los procariontes, junto con otros 2 genes de ADN ribosómicos, el 23S de 2,900 bases y el 5S de 120 bases. Sus órdenes 16S, 23S y 5S. Entre estos genes se encuentran las regiones espaciadoras, que pueden contener uno o más genes ADNt o de transferencia. Los operones ribosómicos en los procariontes se transcriben en una sola molécula de ARN, y más adelante se separan por cortes enzimáticos.

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

Clasificación de los fitoplasmas

Mediante la amplificación de secuencias altamente conservadas de regiones del gen 16S rDNA por PCR y sobreponiendo los productos finales de una digestión enzimática del genoma con enzimas de restricción (RFLP restriction fragment length polymorphisms), se han clasificado a los fitoplasmas en 20 grupos (Lee *et al.*, 1998). Sin embargo, este gen parece no tener suficiente variabilidad como para permitir diferenciar aislados que, siendo clasificados como el mismo fitoplasma, difieren en la planta o en los insectos que los hospedan.

Caracterización molecular de los fitoplasmas

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

Por otra parte, la utilización de la tecnología del ADN recombinante, ha permitido aislar distintos fragmentos cromosómicos y extra cromosómicos de ADN pertenecientes a fitoplasmas, que se han utilizado por un lado, para detectar los fitoplasmas mediante hibridación de ácidos nucleicos en plantas e insectos y, por otro, para establecer nuevas relaciones filogenéticas.

Actualmente se está abordando el estudio de genes diferentes al 16S rRNA para la comprensión de la biología de los fitoplasmas, y con el estudio de la genómica, también se espera dar respuesta a cuales son las condiciones necesarias para su cultivo, así como los factores que intervienen en la especificidad vector-planta. Hasta el momento, se han aislado genes que codifican para proteínas de membrana de diferentes fitoplasmas, a partir de los cuales se han desarrollado sueros monoclonales y policlonales. Estas proteínas de membrana, al igual que en otros Mollicutes, podrían estar implicadas en el reconocimiento específico del huésped y patogénesis.

CONCLUSIONES

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

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

El conocimiento de la diversidad biológica de las cepas de fitoplasma en la naturaleza, será una manera de investigar la epidemiología de las enfermedades inducidas por fitoplasmas y quizá ayude a prevenir la dispersión de esas enfermedades que aparecen en diferentes regiones del mundo debido al intercambio internacional de germoplasma. Esto es esencial cuando una enfermedad inducida por fitoplasmas que es nativa y común en una región puede ser exótica en otra (por ejemplo, el fitoplasma de la manzana es común en Europa pero exótica en América). También es necesaria la información acerca de la variabilidad genética dentro de una cepa de fitoplasma para el desarrollo de plantas resistentes.

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

LITERATURA CITADA

- ALMA, A.; BOSCO, D.; DANIELLI, A.; BERTACCINI, A.; VIBIO, M.; ARZONE, A. 1997. Identification of phytoplasmas in eggs, nymphs and adults of *Scaphoideus titanus* Ball reared on healthy plants. *Insect Molecular Biology* (6): 115-121
- AHRENS, U.; SEEMÜLLER, E. 1992 Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology* (82): 828-832.
- DAIRE, X.; BOUDON-PADIEU, E.; BERVILLE, A.; SCHNEIDER, B.; CAUDWELL, A. 1992. Cloned DNA probes for detection of grapevine avescence doree mycoplasma-like organism (MLO). *Ann Appl Biol* (121): 95-103.
- DOI, Y.; TERENAKA, M.; YORA, K.; ASUYAMA, H. 1967. Mycoplasma or PPLT group-like microorganisms found in the phloem elements of plant infected with mulberry dwarf, potato witches'broom, or pawlonia witches'broom. *Annual Phytopathology Society of Japan* (33): 259
- FOX, G. E.; WISOTZKEY, J. D.; JURTSCHUK, P. JR. 1992. How close is close: 16S RNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *Int J Syst Bacteriol* (42): 166 - 170.
- GUNDERSEN, D. E.; LEE, I.-M.; REHNER, S. A.; DAVIS, R. E.; KINGSBURY, D. T. 1994. Phylogeny of mycoplasma-like organisms (phytoplasmas): a basis for their classification. *J Bacteriol* (176): 5244-5254.
- HANBOONSONG, Y.; CHOOSAI, C.; PANYIM, S.; DAMAK, S. 2002. Trans-ovarial transmission of sugarcane white leaf phytoplasma in the insect vector *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura) *Insect Molecular Biology* (11): 97-103.
- JARAUSCH, W.; SAILLARD, C.; DOSBA, F.; BOVEL, J. M. 1994. Differentiation of mycoplasma-like organisms (MLOs) in European fruit trees by PCR using speci@c primers derived from the sequence of a chromosomal fragment of the apple proliferation MLO. *Appl Environ Microbiol* (60): 2916-2923.
- KIRKPATRICK, B. C.; SMART, C.; BLONQUIST, C.; GUERRA, L.; HARRISON, N.; AHRENS, U.; LORENZ, K. H.; SCHNIDER, B.; SEEMÜLLER, E. 1994. Identification of MLO-specific PCR primers obtained from 16s/23s rRNA spacer sequences. *Proceedings of the 10^a international Congress of the International Organization for Mycoplasmaology (IOM)* 261-262.
- LEE, I. M.; GUNDERSEN-RINDAL, D. E.; DAVIS, R. E.; BARTOSZYK, I. M. 1998. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences *International Journal of Systematic Bacteriology Microbiol* (48): 1153-1169.
- NISHIGAWA; SHIN-ICHI MIYATA; KENRO OSHIMA; TOSHIMI SAWAYANAGI; AKIHIRO KOMOTO; TSUTOMU KUBOYAMA; IZUMI MATSUDA; TSUNEO TSUCHIZAKI; SHIGETOU NAMBA. 2001. In planta expression of a protein encoded by the extrachromosomal DNA of a phytoplasma and related to geminivirus replication proteins. *Microbiology*. (147): 507-513.
- OLSEN, G. J. 1988. Phylogenetic analysis using ribosomal RNA. *Methods Enzymol.* (164): 793-812.
- STACKEBRANDT, E.; GOEBEL, B. M. 1994. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol* (44): 846-849.
- SCHNEIDER, B.; AHRENS, U.; KIRKPATRICK, B. C.; SEEMULLER, E. 1993 Classification of plant-pathogenic mycoplasma-like organisms using restriction-site analysis of PCR amplified 16S rDNA. *J Gen Microbiol* (139): 519-527.

- VERDIN, E.; SALAR, P.; DANET, J. L.; COUEIRI, E.; JREIJIRI F.; ELZAMMAR, S.; GÉLIE, B.; BOVÉ, J. 2003 'Candidatus Phytoplasma phoenicius' sp. Nov., a novel phytoplasma associated with an emerging lethal disease of almond trees in Lebanon and Iran. *Intl. J. Systematic and Evolutionary Microbiology*. (53): 833-838.
- WEISBURG, W. G.; TULLY, J. G.; ROSE, D. L.; PETZEL, J. P.; OYAIZU, D. H.; YANG, L.; MANDELCO, J.; SECHREST, T. G.; LAWRENCE, J.; VAN ETTEN, J.; MANILOFF, C. R.; WHITTAKER, R. H. 1989. New Concepts of Kingdom of organisms. *Science* (163): 150-161.
- WOESE, C. R.; MANILOFF, J.; ZABLEN, L. B. 1980. Phylogenetic analysis of the mycoplasmas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (77): 494-498.
- WOESE, C. R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* (51): 221-271.
- WOESE, C. R.; KANDLER, O.; WHEELIS, M. L. 1990. Toward a natural system of organism: proposal for the domains Archaea, Bacterial and Eucarya. *Proc. Natl. Sc. USA* (87): 4576-4579.