

## Amarillos y enrojecimientos en zanahoria: Una enfermedad a diagnóstico

I. FONT, P. ABAD, M. ALBIÑANA, A. I. ESPINO, E. L. DALLY, R. E. DAVIS y C. JORDA

En el cultivo de la zanahoria (*Daucus carota* L.) se viene observando, en diferentes regiones de España, síntomas que cursan como amarilleamientos y enrojecimientos en hojas, proliferación de hojas y raicillas, así como deformación de raíces, reducción del tamaño y envejecimiento prematuro de las mismas. En las Islas Canarias se encontraba el área de producción más afectada, estando las plantas de zanahoria en campo infestadas por *Cavariella aegopodii* Scop. (Homoptera: Aphididae) y *Bactericera trigonica* Hodk. (Homoptera: Trioziidae). Se realizaron inoculaciones mecánicas y ensayos de transmisión a través del áfido-vector, test ELISA y observaciones al microscopio electrónico, sin poder detectar un agente viral.

La presencia de fitoplasmas en las plantas de zanahoria enfermas procedentes de campo se detectó mediante la amplificación de secuencias específicas del ADN de fitoplasmas. Para ello se aplicó la técnica nested-PCR usando parejas de cebadores universales específicos del ADN ribosómico de fitoplasmas, R16mF2/R1 o P1/P7 seguido de R16F2n/R2. Aplicando esta técnica también se detectó la presencia de fitoplasma en psilas de la especie *B. trigonica*, infectadas de forma natural, y que fueron capturadas sobre plantas de zanahorias enfermas procedentes de campos de las Islas Canarias; así como en plantas de zanahorias cultivadas en invernadero que fueron empleadas en los ensayos de transmisión del fitoplasma a través de la psila-vector y que mostraron síntomas de amarilleamientos y enrojecimientos en las hojas.

El análisis RFLPs (Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción) del producto de la nested-PCR indicó que el fitoplasma presente en las zanahorias enfermas procedentes de campos de Canarias, así como en la psila *B. trigonica* y en zanahorias empleadas en los ensayos de transmisión, se trataba de un fitoplasma incluido dentro del grupo Stolbur subgrupo XII-A (16S rRNA grupo XII, subgrupo A). Así mismo se comprobó que las plantas de zanahoria enfermas procedentes de campos de Segovia estaban infectadas por un fitoplasma incluido dentro del grupo Aster Yellows subgrupo I-B (16S rRNA grupo I, subgrupo B).

Mediante la aplicación de la nested-PCR y el análisis RFLPs se han detectado por primera vez en España la presencia de los fitoplasmas Stolbur y Aster yellows en plantas de zanahoria; y se ha comprobado que la psila *B. trigonica* es un insecto-vector del fitoplasma Stolbur.

I. FONT, P. ABAD, M. ALBIÑANA y C. JORDA: Departamento de Producción Vegetal. Patología Vegetal. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. Universidad Politécnica. Camino de Vera n.º 14. 46022 - Valencia.

A. I. ESPINO: Laboratorio de Sanidad Vegetal. Consejería de Agricultura, Pesca y Alimentación del Gobierno Canario. Santa Cruz de Tenerife. Islas Canarias.

E. L. DALLY y R. E. DAVIS: USDA. A.R.S. Molecular Plant Pathology Laboratory. Beltsville. Maryland 20705. USA.

**Palabras claves:** Fitoplasmas, psila, Stolbur, Aster yellows.

### INTRODUCCIÓN

En España, la superficie ocupada por el cultivo de la zanahoria (*Daucus carota* L.) parece mantenerse estable en la última década entre 6.200-6.600 ha con una producción

anual de 270.000-450.000 t. Existen en España cinco zonas principales productoras de zanahoria; Andalucía Occidental (Cádiz) con 2.705 ha y 110.059 t, Castilla León (Segovia) con 1.924 ha y 111.776 t, La Comunidad Valenciana (Provincia de Valencia) con 448



Fig. 1. - Detalle de un campo de zanahorias que presenta enrojecimientos y amarilleamientos de hojas.



Figs. 2 y 3. - Zanahorias procedentes de Gran Canaria, donde se observan enrojecimientos, amarilleamientos de hojas y deformación de las raíces.



ha y 19.781 t, Castilla La Mancha (provincia de Toledo) con 468 ha y 22.855 t y las Islas Canarias con 344 ha y 5.039 t de producción (M.A.P.A., 1997).

En los últimos 15 años se vienen observando en diferentes zonas productoras de zanahoria de las Islas Canarias sintomatologías anómalas que cursan como amarilleos, enrojecimientos y proliferación de las hojas, así como deformación de raíces, reducción del tamaño y envejecimiento prematuro de las mismas (Figs. 1, 2 y 3). La superficie ocupada por este cultivo en Tenerife es de 261,60 ha y en Gran Canarias de 65 ha, habiéndose detectado síntomas de la enfermedad en parcelas de cultivo de Icod, La Laguna, Tegueste, Las Canteras y Tejina en Tenerife y Santa Brigida, Telde, Guía, Tafira y La Calzada en Gran Canaria. En otras zonas productoras de la España peninsular, como es el caso de Segovia, se observan zanahorias con amarillos, proliferación exagerada de hojas así como de raicillas (Fig. 4).

Dentro del aspecto patológico de este cultivo han sido descritos en la bibliografía diferentes agentes fitopatógenos de etiología diversa, tal como fúngica, bacteriana y vírica; sin embargo pocos datos se pueden aportar respecto a otros agentes tales como fitoplasmas. La sintomatología observada en las zanahorias enfermas, según la bibliografía consultada, no corresponde con una infección fúngica o bacteriana, pero sí podría corresponder con una infección debida a virus y/o fitoplasmas. Entre los agentes de etiología vírica citados en la bibliografía están: el virus del marchitamiento del haba (Broad bean wilt virus), el virus del mosaico del pepino (Cucumber mosaic virus), el virus latente de la zanahoria (Carrot latent virus), el virus del mosaico de la zanahoria (Carrot mosaic virus), el virus del moteado de la zanahoria (Carrot mottle virus), el virus de la hoja roja de la zanahoria (Carrot red leaf virus), el virus de la hoja fina de la zanahoria (Carrot thin leaf virus), el virus de la hoja amarilla de la zanahoria (Carrot yellow leaf virus) y el virus de la mancha amarilla del apio (Celery yellow spot) (JORDA y LLACER, 1996) (Cuadro 1).



Fig. 4. - Zanahorias procedentes de Segovia, mostrando amarillos en hojas y proliferación exagerada de hojas y raicillas secundarias pubescentes.

En cuanto a las enfermedades causadas por fitoplasmas encontramos en la bibliografía consultada amarillos: (Yellows) (LECLANT *et al.*, 1974), el amarilleo del áster (Aster yellows) (ERRAMPALLI *et al.*, 1991; SCHNEIDER *et al.*, 1997; TANNE *et al.*, 1997 y CAZELLES *et al.*, 1999), y Stolbur (VICZIAN *et al.*, 1998). En nuestro país las citas o trabajos sobre problemas patológicos en zanahoria son bastante escasos.

También estos síntomas podrían ser atribuidos a una carencia nutricional en Nitrógeno, Magnesio o Boro (SCAIFE y TURNER, 1983).

En las zanahorias estudiadas, con sintomatologías anómalas, se encontraban presentes pulgones de la especie *Cavariella aegopodii* Scopoli (*Homoptera*, *Aphididae*) (Fig. 5) y psilas de la especie *Bactericera trigonica* Hodk (*Homoptera*, *Triozidae*) (nueva cita en



Fig. 5. - Ninfa del áfido *Cavariella aegopodii* sobre zanahoria.



Fig. 6. - Ninfa de *Bactericera trigonica* Hodk. sobre zanahoria.

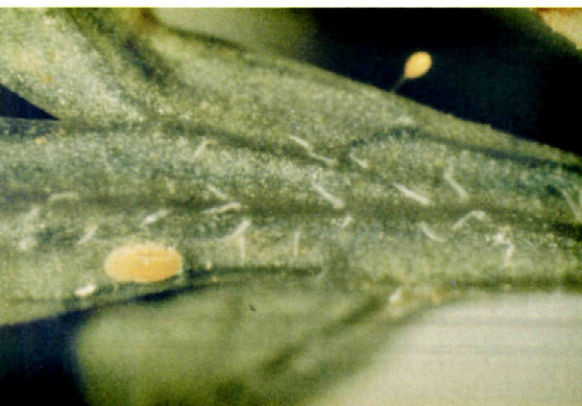


Fig. 7. - Ninfa y puesta de *B. trigonica* Hodk. El huevo está sobre un pedúnculo que lo sujeta al sustrato.

Tenerife) (Figs.6 y 7) siendo el número de psilas encontrado sobre las muestras siempre muy superior al de pulgones.

Alguno de los virus citados en zanahoria, como el Carrot red leaf virus (CMI/AAB, n.º 249), Carrot thin leaf virus (CMI/AAB, n.º 218), Carrot mottle virus (CMI/AAB, n.º 137) y la infección mixta a cargo del Carrot red leaf y Carrot mottle virus denominada Carrot motley dwarf disease, son transmitidos mecánicamente y/o por pulgones de la especie *C. aegopodii*, presentes en el cultivo. Diversas especies de psilas están citadas como vectores de transmisión de fitoplasmas como es el caso de *Cacopsylla pyri* como transmisora del Pear decline en España (AVINENT *et al.*, 1997), y *Trioza nigricornis* como transmisora de proliferación en Francia (LECLANT *et al.*, 1974).

Con estos antecedentes y dado que la enfermedad pudo transmitirse, según se verá más adelante, se descartó la posibilidad de una carencia nutricional, y la identificación de la enfermedad se dirigió al estudio de aquellas virosis o fitoplasmosis que presentaban, según las referencias bibliográficas, características similares a las descritas en las muestras citadas (Cuadro 3). Utilizamos así mismo, y para comprobar la posible entidad patológica implicada, la transmisión por el áfido *C. aegopodii* y la implicación en el síntoma de la psila *B. trigonica*.

## MATERIAL Y METODOS

### Evolución de la enfermedad

De todas las muestras de zanahoria analizadas se seleccionaron algunas, se cortaron las hojas y se trasplantaron a maceta de forma individual, para seguir la evolución de la enfermedad. Estas macetas se abonaron adecuadamente y se dispusieron en dos ambientes con diferente temperatura: en fitotrón (22°C noche - 30°C día y 75% HR) y otras en condiciones menos templadas en invernadero (15-16°C min. - 25°C max. y 80% HR).



Cuadro 1. - Lista de virosis citadas en zanahoria

Nombre inglés	Nombre español	Agente	Grupo	Transmisión
Broad bean wilt	Marchitamiento del haba	Virus esférico (ARN)	Fabavirus	- Afidos (No persis.) <i>Myzus persicae</i> <i>Aphis craccivora</i>
Cucumber mosaic	Mosaico del pepino	Virus esférico (ARN)	Cucumovirus	- Afidos (No persis.) <i>Myzus persicae</i>
Carrot latent	Latente de la zanahoria	Virus bacilari-forme (ARN)	Rhabdovirus	- Afidos <i>Semiaphis heraclei</i>
Carrot mosaic	Mosaico de la zanahoria	Virus flexuoso (ARN)	Potyvirus (?)	-
Carrot mottle	Moteado de la zanahoria	Virus esférico (ARN)	No clasificado	- Afidos (Persistente) <i>Cavariella aegopodii</i>
Carrot red leaf	Hoja roja de la zanahoria	Virus esférico (ARN)	Luteovirus	- Afidos (Pers. Circu.) <i>Cavariella aegopodii</i>
Carrot temperate	-	Virus esférico	No clasificado	- Semilla - Polen
Carrot thin leaf	Hoja fina de la zanahoria	Virus flexuoso (ARN)	Potyvirus	- Afidos (No persis.) <i>Myzus persicae</i> <i>Cavariella aegopodii</i>
Carrot yellow leaf	Hoja amarilla de la zanahoria	Virus flexuoso (ARN)	ClosterovirusI	- Afidos <i>Semiaphis heraclei</i>
Celery yellow spot	Mancha amarilla del apio	Virus esférico (ARN)	Luteovirus (?)	- Afidos <i>Hyadaphis foeniculi</i>

### Microscopio Electrónico

Con extracto crudo de las zanahorias en estudio se prepararon con tampón fosfato 0.01 M, pH 7.2 y tetróxido de osmio 0.2% las muestras para su observación en el microscopio electrónico de transmisión Philips M-400, para así poder detectar posibles partículas de etiología viral que pudieran estar implicadas en la enfermedad.

### Análisis Serológicos

Las plantas de zanahorias enfermas fueron analizadas serológicamente aplicando la técnica DAS-ELISA frente a diferentes antisue-

ros policlonales: Tomato spotted wilt virus (TSWV), Alfalfa mosaic virus (AMV), Potato virus Y (PVY) y Cucumber mosaic virus (CMV).

### Ensayos de transmisión artificial

Se realizaron ensayos de transmisión experimental mediante *C. aegopodii* y ensayos de inoculación mecánica artificial, para así comprobar la transmisión de un posible agente causal. Las plantas indicadoras elegidas para los ensayos de transmisión fueron seleccionadas de las descritas en la bibliografía como plantas indicadoras de los virus anteriormente citados (Cuadro 2).

Cuadro 2. - Listado de plantas indicadoras ensayadas tanto en la inoculación a través de *C. Aegopodii* como en la inoculación mecánica artificial

Especie	Familia
<i>Chenopodium quinoa</i>	Chenopodiáceas
<i>Chenopodium amaranticolor</i> Coste&Reyn	Chenopodiáceas
<i>Coriandrum sativum</i> L.	Umbelíferas
<i>Nicotiana clevelandii</i> Gray	Solanáceas
<i>Nicotiana tabacum</i> L. cv. Xanthi	Solanáceas
<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Leguminosas
<i>Anthriscus cerefolium</i> (L) Hoffm.	Umbelíferas
<i>Apium graveolens</i> L.	Umbelíferas
<i>Petroselinum crispum</i> (Miller) A. W.Hill	Umbelíferas
<i>Daucus carota</i> L.	Umbelíferas

### 1. Ensayo de transmisión experimental mediante *C. aegopodii*

Para comprobar la posible transmisión de la enfermedad a través de *C. aegopodii*, se procedió a la cría de estos áfidos en condiciones de absoluto aislamiento sobre plantas de zanahorias enfermas procedentes de Canarias, sanas y sobre plantas indicadoras (Cuadro 2). Los ensayos de transmisión por áfidos se llevaron a cabo en jaulas bajo malla impidiendo así la fuga de los mismos y la entrada de cualquier otro vector. Este ensayo se llevó a cabo en fitotrón (30°C día-22°C noche, 75%HR).

### 2. Ensayos de inoculación mecánica artificial

El material empleado para las inoculaciones provenía de las muestras de zanahoria enfermas originales de Canarias. El material fue triturado con tampón fosfato 0.01M pH 7.2, Dieca 0.2% y bisulfito sódico 0.2%, siendo la relación peso muestra:volumen tampón inoculación de 1:10. La inoculación mecánica artificial a plantas indicadoras (Cuadro 2) se realizó cuando éstas presentaban 2-3 hojas verdaderas excepto *Phaseolus vulgaris* L. que se inoculó en estado de hojas cotiledonares. Cada extracto se empleó para

inocular a seis plantas de cada una de las especies vegetales elegidas como plantas indicadoras, incorporando en cada ensayo de inoculación testigos negativos (plantas no inoculadas). Las plantas inoculadas se dispusieron en invernadero (32°C día - 25°C noche, máximos a las 12 horas). A los 15 y 30 días después de cada inoculación, se realizó un seguimiento de los síntomas que pudieran manifestar estas plantas.

### 3. Ensayo de transmisión experimental mediante la psila *B. trigonica*

Para estudiar la posible implicación de la psila *B. trigonica* en la enfermedad, se procedió a la cría en jaulas de las mismas sobre las propias plantas de zanahoria enfermas y plantas de zanahoria sanas, en condiciones de absoluto aislamiento. Para realizar este ensayo se emplearon larvas de psilas encontradas sobre plantas de zanahoria enfermas procedentes de Canarias. Las jaulas se dispusieron en fitotrón (30°C día - 22°C noche y 75% HR).

### Extracción de ADN, PCR y análisis RFLPs

Para comprobar la presencia de fitoplasmas mediante PCR, primero se realizó la extracción del ADN de las plantas enfermas

procedentes del campo, de plantas utilizadas en los ensayos de transmisión y de plantas sanas, siguiendo el protocolo descrito por PRINCE *et al.* (1993). Posteriormente se aplicó la técnica «nested-PCR» para la amplificación del ADN ribosómico de fitoplasmas (LEE *et al.*, 1994). Para ello, en la primera amplificación se utilizó una de las dos parejas de cebadores universales de fitoplasmas: R16mF2/R16mR1 (F2/R1) (GUNDERSEN y LEE, 1996) que amplifica un fragmento de ADNr 16S de 1.3 kpb o P1/P7 (DENG e HIRUKI, 1991; SCHNEIDER *et al.*, 1995) que amplifica una secuencia de ADNr de 1.8 kpb. El fragmento de ADNr amplificado se sometió a una segunda amplificación («nested-PCR») con la pareja de cebadores R16F2n/R16R2 (F2n/R2) (GUNDERSEN y LEE, 1996) que amplifica un segmento de ADNr 16S de 1.2 kpb. El producto de la amplificación de ADNr 16S obtenido en esta segunda amplificación fue analizado mediante electroforesis en gel de agarosa 1%

en tampón TAE y digerido con las endonucleasas de restricción *AluI*, *MseI*, *RsaI* y *KpnI* (Boehringer Mannheim). Para el análisis de los fragmentos de ADN obtenidos tras el tratamiento con endonucleasas de restricción, se realizaron electroforesis en gel de poliacrilamida 5% en tampón TBE. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio y se transiluminaron con luz UV para fotografiarlos con película Polaroid 665 o 667. En todos los geles se incluyó ADN marcador y ADN de los fitoplasmas de referencia Aster yellows (AY1) (16S rRNA grupo I, subgrupo I-B) y Stolbur (STOL) (16S rRNA grupo XII, subgrupo XII-A).

## RESULTADOS

### Evolución de la enfermedad

En las zanahorias enfermas trasplantadas para seguir la evolución de la enfermedad se observó que las nuevas hojas brotadas tam-

Cuadro 3. - Cuadro de resultados de las muestras de zanahorias analizadas

ORIGEN	VARIEDAD	N.º MUESTRAS	SÍNTOMAS OBSERVADOS	RESULTADOS	GRUPO FITOPLASMAS
Tenerife (20-02-97)	Chan	1474 a 1478	Amarilleamiento y enrojecimiento de hojas Raíces con deformaciones y envejecimiento prematuro	1474 +	Stolbur
				1475 +	
				1476 -	
				1477 -	
				1478 +	Stolbur
Gran Canaria (28-04-97)		1508 a 1511	Amarilleamiento y enrojecimiento de hojas Raíces con deformaciones y envejecimiento prematuro	1508 +	Stolbur
				1509 +	
				1510 +	
				1511 +	
Tenerife (23-07-97)	Riola	1582	Amarilleamiento y enrojecimiento de hojas Raíces con deformaciones y envejecimiento prematuro	¿+?	¿Infección mixta?
Tenerife (13-10-97)		1648	Amarilleamiento y enrojecimiento de hojas Raíces con deformaciones y envejecimiento prematuro Proliferación de hojas.	¿+?	¿Infección mixta?
Segovia (11-11-98)	Bolero	1925	Hojas con amarillos. Proliferación de hojas y raicillas secundarias pubescentes.	+	Aster yellows



Fig. 8. - Planta de zanahoria utilizada en el ensayo de transmisión mediante *B. trigonica* Hodk. Que desarrolló síntomas de amarillos y enrojecimientos en las hojas.

bién presentaban la misma sintomatología; pero se observaron diferencias en el momento de la aparición de los síntomas entre aquellas que se mantuvieron en fitotrón en condiciones estivales de 30°C día, 22°C noche y 75% HR de las que permanecieron en lugar menos templado entre 15-16 °C de mínima, 28 °C de máxima y 80% de HR condiciones estas del invernadero. Las hojas nuevas que brotaban de las zanahorias crecidas en fitotrón presentaban los síntomas de la enfermedad antes que las zanahorias colocadas en lugar menos templado.

#### Microscopio Electrónico; análisis serológicos; ensayos de transmisión mediante *C. aegopodii* y ensayos de inoculación mecánica artificial

Las observaciones de las preparaciones al microscopio electrónico no fueron concluyentes ya que no se observó ninguna partícula flexuosa, lo que descartaba el Carrot mosaic virus, Carrot thin leaf y Carrot yellow leaf; ni tampoco bacilariforme, lo que excluía al Carrot latent virus. La posibilidad se centraba entonces en los virus de partículas esféricas como el Carrot mottle y Carrot red leaf transmitidos por el áfido *C. aegopo-*

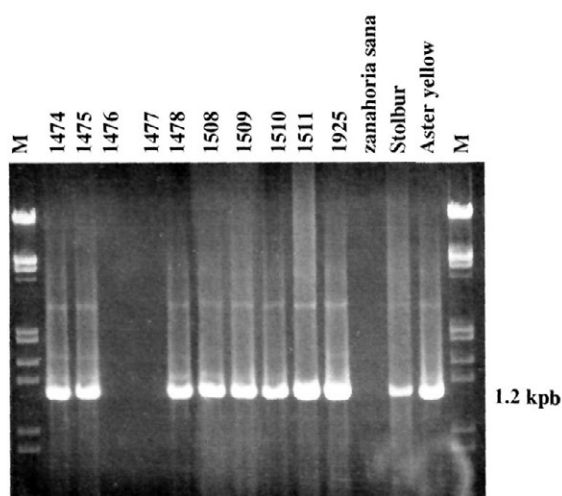


Fig. 9. - ADNr 16S amplificado con los primers F2n/R2. Marcados (M):  $\lambda$ DNA/Eco RI + Hind III cuyos fragmentos son 21226, 5148, 4973, 4268, 3530, 2027, 1904, 1584, 1375, 947, 831 y 564 pb.

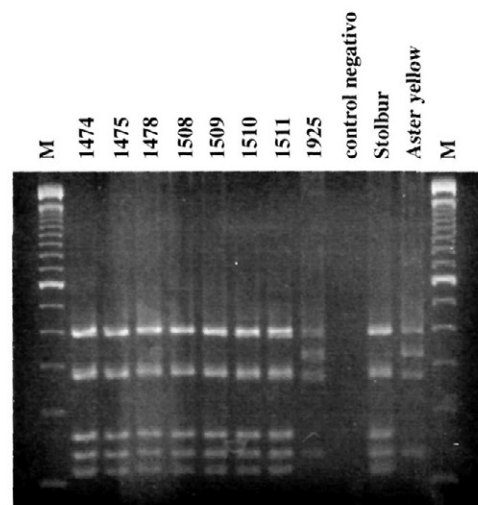


Fig. 10. - Análisis RFLP de las muestras de zanahoria en gel de agarosa al 3% del ADNr 16S digerido con la endonucleasa de restricción *Mse*I. Marcador (M): escalera de 100 pb cuyos fragmentos son 2072, 1500, 600 y 100 pb. Los fitoplasmas de referencia son STOL y AYI.

*dii*, pero los resultados de la transmisión a través de estos pulgones así como la inoculación mecánica artificial fueron en todos los casos negativos, no mostrando las plantas indicadoras utilizadas respuesta alguna.



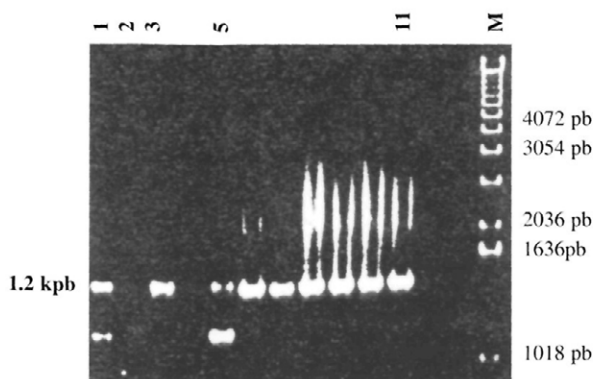


Fig. 11. - ADNr 16S amplificado con los primers F2n/R2 de diversos cultivos infectados por fitoplasmas. pocillos 1-3: zanahorias 1646, 1647 y 1648. Pocillo 5: zanahoria 1582. Pocillo 11: CX, Canada X disease (control positivo). Marcado (M): escalera de 1 Kb.

También se obtuvieron resultados negativos en los análisis serológicos; por lo tanto se descartó la posibilidad de que se tratara de alguno de los virus analizados.

### Ensayo de transmisión mediante *B. tragonica*.

Las plantas de zanahoria sanas sobre las que se alimentaron y desarrollaron psilas procedentes de zanahorias enfermas, empezaron a desarrollar síntomas similares a los observados en plantas enfermas originales de Canarias; los síntomas iniciales pasadas 4-5 semanas del comienzo del ensayo de transmisión, eran amarillos en los bordes de las hojas que más tarde evolucionaban a enrojecimientos (Fig. 8).

Por tanto, estas psilas sospechamos que puedan ser capaces de transmitir un patógeno a las plantas de zanahorias utilizadas en el ensayo de transmisión, estando en estudio y comprobación este punto.

### PCR y análisis RFLPs

Del ADN extraído de las muestras 1474, 1475, 1478, 1508, 1509, 1510, 1511 con amarillos, enrojecimientos de hojas, raíces

deformadas y envejecimiento prematuro de las mismas originales de las Islas Canarias y de la muestra 1925 con amarillos y proliferación exagerada de hojas y raicillas procedente de Segovia, se amplificó mediante «nested-PCR» un fragmento de ADN de 1.2 kpb que coincide con el tamaño esperado de la secuencia del ADNr 16S de los fitoplasmas delimitado por los cebadores F2n/R2 (Fig. 9). El patrón de bandas obtenido tras digerir el producto de la segunda amplificación con las endonucleasas de restricción *AluI*, *MseI*, *KpnI* y *RsaI* confirman la presencia de un fitoplasma del grupo Stolbur (subgrupo rRNA XII-A) (LEE *et al.*, 1998) en las plantas de zanahoria procedentes de las Islas Canarias y un fitoplasma del grupo Aster yellow (subgrupo rRNA I-B) (LEE *et al.*, 1998) en la muestra procedente de Segovia. La figura 10 muestra el patrón de bandas tras la digestión con *MseI*, endonucleasa que permite diferenciar AY y STOL. En los ADN purificados de las muestras canarias 1476 y 1477 no se obtuvo amplificación. El ADN extraído de zanahorias sanas dió resultados negativos en la nested-PCR.

En el caso de las muestras 1582 y 1646 originarias de Tenerife, se amplificaron mediante «nested-PCR» dos segmentos de ADN con los cebadores P1/P7 y F2n/R2 o F2/R1 seguido de F2n/R2, el tamaño de una de las bandas fue ligeramente superior al esperado (1.2 kpb), teniendo la otra banda un tamaño de 800 pb (Fig. 11). El patrón RFLP del producto de amplificación de una misma muestra tras ser digerido con *AluI*, *MseI* y *KpnI* difería según se hubiera amplificado el ADN con las parejas de cebadores P1/P7F2n/R2 o F2/R1F2n/R2. Cuando en la primera amplificación se utilizaron los cebadores F2/R1, el análisis RFLP coincidió con el patrón de restricción del fitoplasma de referencia AY1 (subgrupo 16S rRNA I-B); sin embargo, cuando la nested-PCR se llevó a cabo empleando los cebadores P1/P7 en la primera amplificación, el análisis RFLP no era concluyente, ya que los fragmentos de ADN observados en la electroforesis PAGE 5% no coincidían con el patrón RFLP de ningún fitoplasma descrito hasta el

momento. Este resultado podría corresponder, según lo descrito en la bibliografía, con una posible infección mixta compuesta por un fitoplasma y otro microorganismo patógeno (GIANNOTTI *et al.*, 1974).

La amplificación del ADN de las plantas de zanahoria transmitidas experimentalmente por la psila *B. trigonica* indicó que habían sido infectadas por un fitoplasma y los resultados de los análisis RFLPs confirmaron que se trataba del mismo fitoplasma (grupo Stolbur) que estaba infectando a las zanahorias enfermas de las que procedían las psilas.

## DISCUSIÓN

A la vista de los resultados, la enfermedad diagnosticada en las zanahorias de Canarias, que origina amarillos, enrojecimientos en hojas, deformación y envejecimiento prematuro de raíces está causada por el fitoplasma Stolbur (subgrupo 16S rRNA XII-A), siendo esta la primera cita en España de Stolbur en el cultivo de la zanahoria y la psila *B. trigonica* como vector de transmisión de esta enfermedad. En las zanahorias que presentan amarillos y proliferación exagerada de hojas y raicillas secundarias pubescentes procedentes de Segovia el agente implicado

se trata de un fitoplasma incluido dentro del grupo del Aster yellows (subgrupo 16S rRNA I-B). Pero en dos de las muestras analizadas procedentes de Tenerife se detecta una posible infección mixta compuesta por un fitoplasma y un microorganismo no identificado por el momento (Cuadro 3).

## AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo ha sido realizado a través del convenio de colaboración que tiene la Unidad de Virología Vegetal del Dpto. de Producción Vegetal de la Universidad Politécnica de Valencia para el diagnóstico, detección e identificación de enfermedades producidas por virus, viroides y fitoplasmas y la Dirección General de Sanidad de la Producción Agraria.

Agradecemos a D. LORENZO COULLAUT-VALERA TERROBA del Servicio de Sanidad y Producción Vegetal de Segovia por enviarnos plantas de zanahorias enfermas.

Agradecemos especialmente a D. JOSEP COSTA COMELLES (q.e.p.d.) de la Unidad Docente de Entomología Vegetal de esta Universidad su apoyo en la clasificación y en la realización de las fotos de los insectos citados en el presente trabajo.

## ABSTRACT

FONT I., P. ABAD, M. ALBIÑANA, A. I. ESPINO, E. L. DALLY, R. E. DAVIS y C. JORDA, 1999. *Bol. San. Veg. Plagas*, 25 (3): 405-415.

In different regions of Spain, carrot plants (*Daucus carota* L.) have exhibited symptoms of yellows disease, such as small leaves with yellowing and reddening colorations, proliferation of leaves and small roots, deformation, reduction, and early senescence of roots. The production area most affected was the Canary Islands, where carrot plants in the field were infested by *Cavariella aegopodii* Scop. (Homoptera: Aphididae) and *Bactericera trigonica* Hodk. (Homoptera: Triozidae). It was not possible to detect a viral agent by mechanical and aphid-vectored transmission assays, ELISA tests and electron microscopy.

The presence of phytoplasma in carrot plants in the field was revealed by the amplification of phytoplasma-specific DNA sequences in nested-PCR using phytoplasma ribosomal DNA-universal primer pairs, R16mF2/R1 or P1/P7 followed by R16F2n/R2. Nested-PCR also revealed the presence of phytoplasma in naturally infected *B. trigonica* psyllids captured on diseased carrot plants in the field in Canary Islands, and in greenhouse-grown carrot plants that developed yellowing symptoms in assays of psyllid-vectored transmission of the phytoplasma.

Restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of DNA products from nested PCR indicated that phytoplasma strains in diseased carrot from the field, in *B. trigonica*, and in carrot plants in the transmission assays, all belonged to the Stolbur phytoplasma subgroup XII-A (16S rRNA group XII, subgroup A). Parallel PCR and RFLP assays revealed that diseased carrot plants from the field in Segovia were infected by strains of a phytoplasma belonging to the Aster yellows phytoplasma subgroup I-B (16S rRNA group I, subgroup B).

For the first time, Stolbur and Aster yellows phytoplasmas have been detected in carrot in Spain, and for the first time psyllid *B. trigonica* has been discovered as the insect vector of stolbur phytoplasma.

**Key words:** Phytoplasma, psyllid, Stolbur, Aster yellows.

## REFERENCIAS

- Anuario de Estadística Agraria. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (Ed): 258-259.
- AVINENT, L.; LLACER, G., y ALMACELLAS, J. 1997: Pear decline in Spain. *Plant Pathology*. 46, 694-698.
- CAZELLES, O., y BALADOU, M. 1999: Premier signalement de l'Aster yellow sur la carotte en Suisse. *Revue suisse de viticulture arboriculture horticulture*. 31(2), 71-72.
- DENG, S., y HIRUKI, C., 1991: Amplification of 16s rRNA genes from culturable and nonculturable mollicutes. *J. Microbial. Methods*. 14: 53-61
- Descriptions of Plant Viruses. July 1974. n°: 137. *Commonwealth Agricultural Bureaux, Association of Applied Biologists*.
- Descriptions of Plant Viruses. September 1980. n°: 218. *Commonwealth Agricultural Bureaux, Association of Applied Biologists*.
- Descriptions of Plant Viruses. July 1982. n°: 249. *Commonwealth Agricultural Bureaux, Association of Applied Biologists*.
- ERRAMPALLI, D.; FLETCHER, J., y CLAYPOOL, P. L., 1991: Incidence of yellows in carrot and lettuce and characterization of mycoplasma-like organism isolates in Oklahoma. *Plant Dis*. 75, 579-584.
- GIANNOTTI, J.; LOUIS, C.; LECLANT, F.; MARCHOUX, G., y VAGO, C., 1974: Infection due to mycoplasmas and to micro-organisms with rickettsia pattern in a plant affected by proliferation and in the psyllid vector of the disease. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances L'cademie des Sciences*, D. 278(4): 469-471.
- GUNDERSEN, D. E., y LEE, I. M., 1996: Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathol. Mediterr*. 35: 144-151.
- JORDA, C., y LLACER, G., 1996: Lista de virosis descritas en los distintos grupos de plantas cultivadas. En: *Patología Vegetal*. Tomo: I. LLACER, G., LOPEZ, M. M., TRAPERO, A. y BELLO, A. (Eds): 379-426. Sociedad Española de Fitopatología.
- LECLANT, F.; MARCHOUX, G., y GIANNOTTI, J., 1974: Demonstration of the vector role of the psyllid *Trioza nigricornis* Forst (Homoptera insect) in the transmission of a proliferation disease of *Daucus carota* L. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de L'cademie des Sciences*, D. 278(1): 57-59.
- LEE, I. M.; GUNDERSEN, D. E.; HAMMOND, R. W., y DAVIS, R. E., 1994: *Use of mycoplasma-like organism (MLO) group-specific oligonucleotide primers for*



- nested-PCR assays to detect mixed-MLO infections in a single host plant. Phytopathology.* 84: 559-566.
- LEE, I. M.; GUNDERSEN-RINDAL, D. E.; DAVIS, R. E., y BARTOSZYK, I. M., 1998: Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48: 1153-1169.
- PRINCE, J. P.; DAVIS, R. E.; WOLF, T. K.; LEE, I. M.; MONGEN, B. D.; DALLY, E. L.; BERTACCINI, A.; CREDI, R., y BARBA, M., 1993: Molecular detection of diverse mycoplasma-like organisms (MLOs) associated with grapevine yellows and their classification with aster yellows, X-disease, and elm yellows MLOs. *Phytopathol.* 83: 1130-1137.
- SCAIFE, A., y TURNER, M., 1983: *Diagnosis of Mineral Disorders in Plants*. Vol. 2: Vegetables. Robinson, J.B.D. (Ed): 36-40. Agricultural Research Council.
- SCHNEIDER, B.; SEEMÜLLER, E.; SMART, C. D., y KIRKPATRICK, B. C., 1995: Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas. En: *Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology*, vol. I. Razin, S., y Tully, J.G. (Eds): 369-380. Academic Press. San Diego, California.
- SCHNEIDER, B.; MARCONE, C.; KAMPMANN, M.; RAGOZZINO, A.; LEDERER, W.; COUSIN, M. T. y SEEMÜLLER, E., 1997: Characterization and classification of phytoplasmas from wild and cultivated plants by RFLP and sequence analysis of ribosomal DNA. *Eur. J. Plant Pathol.* 103, 675-686.
- TANNE, E.; ORENSTEIN, S., y FRANK, A., 1997: Phytoplasma-associated yellows disease of carrot in Israel. *Phytoparasitica.* 25, 246.
- VICZIAN, O.; SULE, S., y GABORJANYI, R., 1998: Natural host plants of stolbur phytoplasma in Hungary. *Novenyvedelem.* 34:11, 617-620.

(Recepción: 29 julio 1999)  
(Aceptación: 21 septiembre 1999)