

Evaluación de métodos basados en la PCR para la detección del fitoplasma asociado a la enfermedad de la “Flavescencia dorada” en vid.

M.P. MARTÍN y E. TORRES

Se han investigado cuatro métodos de extracción y dos protocolos de amplificación por PCR para la detección del fitoplasma flavescencia dorada en viñas. Para comprobar si las diferencias de tejido pueden afectar a la extracción y detección de fitoplasmas, se han incluido en el estudio hojas de vinca inoculada con fitoplasmas del grupo stolbur, fitoplasma asociado con frecuencia a vid. Para las reacciones de amplificación se han utilizado los iniciadores fU5/rU3 que permiten obtener copias de una región de unas 900 bp del 16S rDNA.

A partir de los aislamientos de DNA con los cuatro métodos de extracción de hojas de viñas con síntomas de flavescencia dorada, y tras el protocolo de amplificación estándar, no se visualizó ningún amplímero. Sin embargo, con tres de los cuatro métodos de extracción y mediante PCR-Beads, se visualizaron los amplímeros del fitoplasma.

La combinación de E.Z.N.A., un kit comercial diseñado para extraer DNA de plantas, y la amplificación directa con Ready-To-Go PCR Beads resultó ser el procedimiento mejor y más rápido (de los ocho testados) para la detección de fitoplasmas en viña.

Todos los métodos de extracción combinados con cualquier protocolo de amplificación consiguieron detectar fitoplasmas en todas las muestras de vinca.

M.P. MARTÍN: Real Jardín Botánico, C.S.I.C., Plaza de Murillo 2, 28014 Madrid. e-mail: maripaz@ma-rjb.csic.es

E. TORRES: Servei de Sanitat Vegetal, Via Circunval·lació Nord, Tram VI, Cant. C/3, Zona Franca, 08040 Barcelona, Spain. e-mail: ssausv@lander.es

Palabras clave: Extracción DNA, amplificación 16 rDNA, Stolbur, identificación fitoplasmas.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad flavescencia dorada (FD), asociada a fitoplasmas no cultivables (“mycoplasma-like organism”), se transmite en viñas a través del cicadélido *Scaphoideus titanus* Ball. En viña, la enfermedad madera negra (Bois Noir-BN) asociada a fitoplasmas del grupo stolbur produce síntomas similares a los de la FD; aunque el *S. titanus* no es capaz de transmitir fitoplasmas del grupo stol-

bur (BATTLE *et al.*, 1995; BOUDON-PADIEU, 1996; COUSIN, 1995; DAIRE *et al.*, 1993). El desarrollo de métodos de diagnóstico para estas enfermedades es esencial para el diagnóstico y estudios epidemiológicos.

La detección de fitoplasmas se ha basado en microscopía electrónica o fluorescente utilizando el fluorocromo de DNA 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) y DNA (o RNA) específico (KIRKPATRICK *et al.*, 1987); sin embargo, la detección utilizando la reac-

ción en cadena de la polimerasa (PCR) es más sensible (AHRENS & SEEMÜLLER, 1992; DAIRE *et al.*, 1992), aunque para obtener suficiente DNA para ser detectado por PCR se necesitan entre 0.5 y 2 g de tejido de planta. Además, muchas veces se requiere una doble amplificación ("nested PCR"): primero una amplificación con iniciadores externos, como P1/P7 (DENG & HIRUKI, 1991; SMART *et al.*, 1996), y una segunda amplificación con iniciadores internos, como fU5/rU3 (LORENZ *et al.*, 1995).

Para aislar DNA de fitoplasmas se han utilizado con éxito distintos métodos en plantas cultivadas utilizando tampón de extracción con 1% SDS (BATLLE *et al.*, 1995), mientras que otros autores han utilizado el tampón de extracción con 2% CTAB (AHRENS & SEEMÜLLER, 1992; AVINENT & LLACER, 1994, 1995; AVINENT *et al.*, 1997; LORENZ *et al.*, 1995; MARCONE *et al.*, 1997; SCHENEIDER *et al.*, 1993). En ambos protocolos se requiere 2% β -mercaptoethanol para inhibir la oxidación de polifenoles y cloroformo para purificar el DNA.

El objetivo principal de este trabajo consiste en desarrollar un método para la detección rutinaria de fitoplasmas utilizando cantidades pequeñas de tejido de la planta (20 mg) evitando reactivos tóxicos. Para ello se han ensayado cuatro métodos de extracción; entre ellos, un kit comercial diseñado para extraer DNA de plantas que no requiere solventes orgánicos (fenol, cloroformo). Así como dos protocolos de amplificación (PCR estándar y Ready-to-Go Beads).

MATERIAL Y MÉTODOS

Material

Se analizaron hojas de viñas sin síntomas de fitoplasmas (FD-1) y con síntomas de FD (FD-2), procedentes de Agullana (Alt Empordà, Girona). También viñas positivas a FD (FD-3) estudiadas con anterioridad (RAHOLA *et al.*, 1997). Las muestras de FD-1 y FD-2 fueron recogidas en el verano de 1997

en el mismo foco que FD-3. Tres grupos de hojas de vinca (STOL-1, STOL-2, STOL-3), inoculadas con fitoplasma stolbur, fueron cedidas por el IRTA de Cabrils (Barcelona). Todas las muestras se habían conservado a -20°C durante unos 2 años antes de ser utilizadas.

Extracción del DNA. Se utilizaron 20 mg de nervios principales de viñas y la misma cantidad de hoja de vinca. Las muestras se cortaron en pequeñas piezas con hoja de bisturí y se depositaron en tubos eppendorf de 1.5 ml. Se ensayaron cuatro métodos de extracción:

Método A basado en WHITING *et al.* (1997). Tampón de lisis: 50 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, 1% SDS. Tras incubación toda la noche a 55°C con 800 μl de tampón de lisis y posterior centrifugación para eliminar los restos vegetales, el DNA se purificó de cuatro o cinco veces con 600 μl fenol:cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1). El DNA se precipitó con etanol frío (30 min a -80°C o 2 h 30 min a -20°C o 12 h a -4°C), y el precipitado se lavó con 600 μl de etanol 70% frío. El DNA se resuspendió en 200 μl de agua Milli-Q estéril. El tiempo total empleado para esta extracción fue de 14 h 30 min (incluyendo la incubación de 12 h).

Método B basado en DOYLE & DOYLE (1990) y AHRENS & SEEMÜLLER (1992). Tampón de lisis: 3% CTAB, 1 M Tris pH 8, 1.4 M NaCl y 20 mM EDTA pH 8. Se añadió β -mercaptoetanol 0.2% inmediatamente antes de la extracción. Tras una incubación de 30 min a 65°C con 350 μl de tampón de lisis, el DNA se lavó con 350 μl de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y se precipitó con 350 μl de isopropanol. El precipitado se lavó con 350 μl de etanol frío al 70% y el DNA se resuspendió en 50 μl de agua Milli-Q estéril. El tiempo total requerido fue de 45-50 min.

Para comprobar si el mercaptoetanol es imprescindible en el tampón de lisis, se repitió este protocolo sin añadir este reactivo tóxico al tampón (Método B2).

Método C basado en la minipreparación de DNA de WEISING *et al.* (1995). Tampón de lisis: 140 mM Sorbitol, 220 mM Tris-HCl, 25 mM EDTA, 800 mM NaCl, 0.8% SDS, 1% Sarkosyl, 0.2% mercaptoetanol (añadido justo antes del uso). Tras una incubación de 10 min a 55°C con 1 ml de tampón de lisis y extracción con 400 µl de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), el DNA se precipitó con 480 µl de isopropanol. El precipitado se lavó dos veces con 1 ml de etanol 70% y se resuspendió con 50 µl de agua Milli-Q estéril. El tiempo total fue de 30-35 min.

Método D. Se utilizó el kit E.Z.N.A. Plant DNA Miniprep (Omega Biotech) siguiendo las instrucciones del fabricante, pero sin añadir RNasa ni mercaptoetanol. El DNA extraído se resuspendió con 50 µl de agua Milli-Q estéril. El tiempo total fue de 25 min.

Amplificación por PCR. Se utilizaron los iniciadores fU5 y rU3 (LORENZ *et al.*, 1995) para amplificar parte del gen del ARN ribosomal 16S. Se han seguido dos protocolos:

Protocolo de amplificación A (protocolo estándar). Las reacciones de PCR se hicieron en un volumen total de 20 µl. Cada reacción contenía 10 µl de DNA total, 10 pmol.ml⁻¹ de cada iniciador, 200 mM dNTP (Pharmacia-Biotech), 1.5 mM MgCl₂, 0.5 unidades de Taq polymerase (Applied biosystems) y el tampón de PCR para dicho enzima. También se ensayó una mezcla de reacción con una concentración final de MgCl₂ de 3mM.

Se incluyeron controles negativos (sin DNA total) en cada serie de amplificación.

Protocolo de amplificación B. Ready-To-Go ® PCR Beads (Amersham-Pharmacia Biotech) que contienen todos los reactivos necesarios (incluyendo 1.5 mM MgCl₂), excepto iniciadores y el DNA, para reacciones de PCR en un volumen final de 25 µl. En

cada reacción se añadió 1 µl de DNA total junto con 0.5 µl de cada iniciador (concentración final de 0.5 µM) y 23 µl de agua estéril milli-Q.

Las amplificaciones se realizaron utilizando un termociclador Progen (Techne) con una desnaturalización inicial a 94 °C durante 12 min (Amplificación A) o 5 min (Amplificación B), ya que es el tiempo que se requiere para la activación del enzima de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Los parámetros para cada ciclo de amplificación fueron: desnaturalización del DNA a 94°C durante 30 sec, hibridación de los iniciadores a 55°C durante 60 sec, y extensión del DNA a 72°C durante 60 sec.

El resultado de las amplificaciones se determinó a partir de alícuotas de 5 µl, mediante electroforesis en agarosa al 2% (SERVA) en tampón 1 x TAE durante 30 min a 5 V cm⁻¹. El DNA se tiñó con bromuro de etidio presente en el gel de agarosa (0.4 µg ml⁻¹). El tamaño de los productos de PCR se estimó por comparación con el marcador φ X 174 RF DNA/Hae III Fragments (Gibco, BRL). Los geles se fotografiaron con película Polaroid™.

Para identificar las amplificaciones obtenidas, alícuotas de 5 µl del producto se sometieron a digestión enzimática mediante *Alu I* y *Kpn I* (Análisis de PCR-RFLP; MARTÍN & TORRES, 1998).

RESULTADOS

El DNA total obtenido de cada método de extracción fue: A) de 10 a 40 ng/µl, B) de 100 a 200 ng/µl, C) de 1.5 a 20 ng/µl y D) de 3 a 13 ng/µl.

Los resultados de las amplificaciones de cada una de las extracciones se muestran en la Tabla 1 (amplificación estándar) y la Tabla 2 (Ready-to-Go-PCR Beads). No se detectaron productos de PCR de los controles negativos.

Tabla 1.—Detección de fitoplasmas (+) utilizando el protocolo de PCR estándar con DNA sin diluir y diluido (1:100). NT: No testado

Muestras	Métodos de extracción de DNA									
	A SDS		B CTAB + β -mercapto		B2 CTAB		C SDS + Sorbitol + Sarkosyl + β -mercapto		D E.Z.N.A.	
	Direct	1:100	Direct	1:100	Direct	1:100	Direct	1:100	Direct	1:100
FD-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FD-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FD-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
STOL-1	-	+	+	NT	+	NT	+	NT	+	NT
STOL-2	-	+	+	NT	+	NT	+	NT	+	NT
STOL-3	-	+	+	NT	+	NT	+	NT	+	NT

Tabla 2.—Detección de fitoplasmas (+) utilizando Ready-to-Go-PCR Beads con DNA sin diluir y diluido (1:100). NT: No testado

Muestras	Métodos de extracción de DNA									
	A SDS		B CTAB + β -mercapto		B2 CTAB		C SDS + Sorbitol + Sarkosyl + β -mercapto		D E.Z.N.A.	
	Direct	1:100	Direct	1:100	Direct	1:100	Direct	1:100	Direct	1:100
FD-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FD-2	-	-	+	NT	-	-	+	NT	+	NT
FD-3	-	-	+	-	-	-	-	-	+	NT
STOL-1	+	NT	+	NT	+	NT	+	NT	+	NT
STOL-2	+	NT	+	NT	+	NT	+	NT	+	NT
STOL-3	+	NT	+	NT	+	NT	+	NT	+	NT

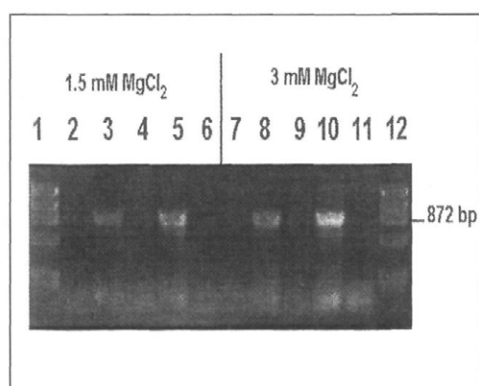


Fig. 1.—Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR obtenidos, con muestras de vinca, utilizando el protocolo de amplificación estándar y el método de extracción A. Carriles 2, 3, 7, 8: STOL-3. Carriles 4, 5, 9, 10: STOL-1 (carril 3,5,8 y 10: dilución 1:100). Carriles 6 y 11: controles negativos. Carriles 1 y 12: marcador ϕ X 174 RF DNA/Hae III.

• Amplificación estándar

De los aislamientos de DNA procedente de vinca, tras la amplificación con el protocolo estándar, se detectaron bandas de aproximadamente 880 pb con todos los métodos excepto de la extracción A de la que sí se obtuvo amplímero a partir de diluciones (1:100). Al incrementar la concentración de $MgCl_2$ en la mezcla de reacción de 1.5 mM a 3 mM (Fig. 1) se obtuvo más producto de fitoplasma (bandas más luminosas en el gel).

De las hojas de vid no se detectó fitoplasma con ningún método de extracción amplificando según el protocolo estándar. Tampoco resultó efectivo diluir el DNA 1:100 ni incrementar la concentración de $MgCl_2$.

• **Amplificación con PCR beads**

Utilizando la amplificación con PCR beads, se visualizaron bandas de 880 pb a partir del DNA obtenido con los métodos de extracción B (Fig. 2), C y D de la muestra FD-2 (hojas sintomáticas) y con los métodos de extracción B y D (Fig. 2) de FD-3 (hojas positivas a flavescencia dorada). No se detectó producto de PCR a partir del aislamiento de DNA de hojas sanas de viñas (FD-1). Como se indica en la tabla 2 no se obtuvieron amplificaciones utilizando el método de extracción B2 ni de la muestra FD-2 (Fig. 3) ni de la FD-3.

Se detectaron fitoplasmas de todos los aislamientos de DNA de las hojas de vinca obtenidos con los cuatro métodos de extracción; aunque, con este protocolo de amplificación se obtiene más cantidad de producto

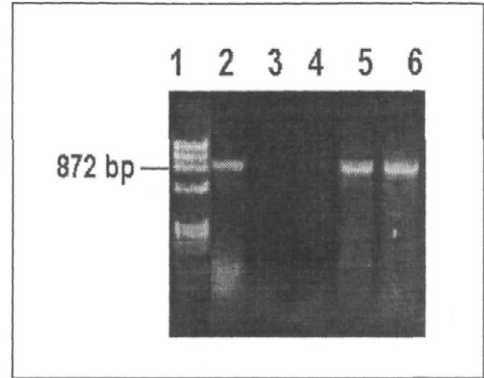


Fig. 2.—Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR obtenidos utilizando Ready-to-Go PCR beads. Muestra FD-2; DNA extraído con el método B (carril 2) y con el método B2 (carril 3). Muestra FD-3; DNA extraído con el método A (carril 4), con el método D (carril 5) y con el método B (carril 6). Carril 1: marcador ϕ X 174 RF DNA/Hae III.

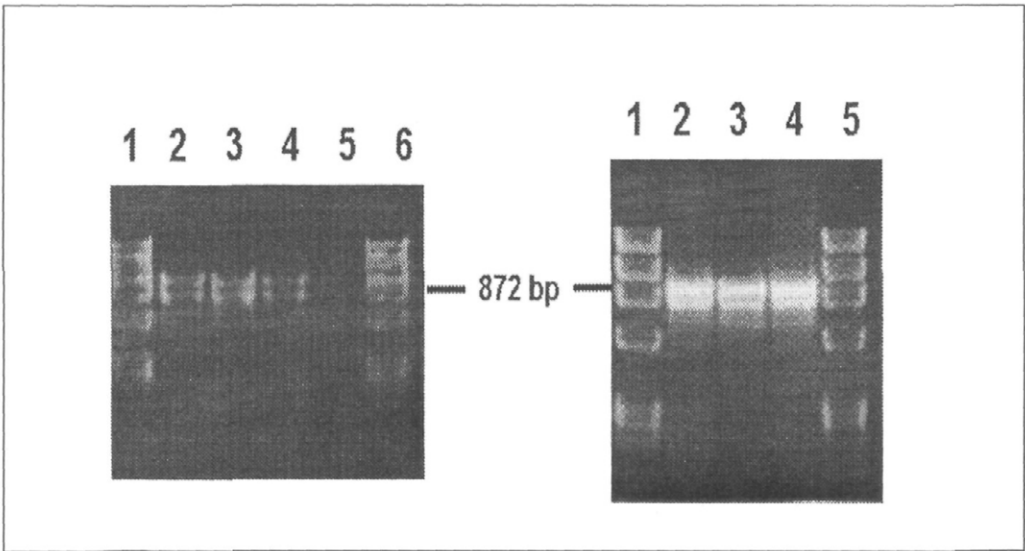


Fig. 3.—Geles de agarosa de los productos de PCR de las extracciones de vinca utilizando el método A. Productos obtenidos utilizando protocolo de amplificación estándar A (izquierda) de las diluciones 1:100. Productos obtenidos tras amplificar utilizando PCR-beads (derecha). Carril 2: STOL-1. Carril 3: STOL-2. Carril 4: STOL-3. Carril 5: negativo. Carriles 1 y 6: marcador ϕ X 174 RF DNA/Hae III.

de PCR (bandas mas luminosas en el gel) que con el protocolo de amplificación estándar (Fig. 3).

Los patrones obtenidos tras la digestión con *Alu* I (Fig. 4) y *Kpn* I (Fig. 5) permitirán discriminar entre las amplificaciones de flavescencia dorada y stolbur.

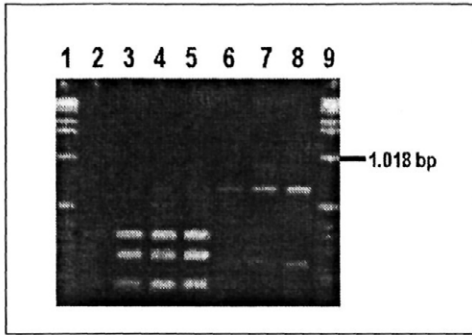


Fig. 4.—Digestión con *Alu* I de los productos de PCR. Carriles 2-5: Stolbur; Carriles 6-8: FD. Carriles 1 y 9: marcador ϕ X 174 RF DNA/Hae III.

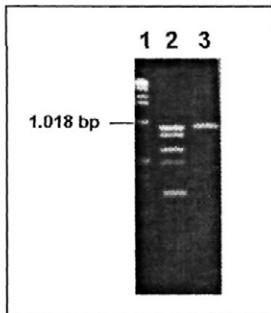


Fig. 5.—Digestión con *Kpn* I de los productos de PCR. Carril 2: Stolbur; Carril 3: FD. Carril 1: marcador ϕ X 174 RF DNA/Hae III.

DISCUSIÓN

• Extracción A

El método de extracción A, tanto combinado con amplificación estándar como con PCR beads permite la detección de fitoplasmas en hojas de vinca, pero no a partir de viñas; aunque en vinca, como hemos indicado, se detectó más producto utilizando PCR beads. Además, utilizando el protocolo estándar de amplificación, no fue posible la detección de fitoplasmas sin ajustar la dilución apropiada de la extracción (en general, 1:100) o incrementando la concentración de $MgCl_2$ a 3 mM en la mezcla de reacción. Diluir el DNA es una estrategia común para obtener buenos resultados con las reacciones de PCR porque, aunque se reduce la concentración de DNA, también se diluyen inhibi-

dores como azúcares y polifenoles (MARTÍN *et al.*, 1998).

• Extracción B

La presencia o ausencia de mercaptoetanol en el tampón de lisis del método de extracción B no afectó a la posterior detección de fitoplasmas de hojas de vinca. En cambio, en este estudio, para la detección de fitoplasmas en viñas, el mercaptoetanol resultó esencial.

• Extracción C

El tampón del método de extracción contiene sorbitol y sarkosyl, componentes que cambian la permeabilidad de la pared celular, facilitando su rotura y la liberación de DNA. A pesar de que el tampón de lisis incluía mercaptoetanol, el precipitado obtenido de las viñas era oscuro y gelatinoso. No se obtuvieron productos de amplificación de ningún extracto de DNA de viñas utilizando el protocolo estándar, y sólo fue posible detectar fitoplasmas de FD-2 tras amplificar con PCR-Beads.

• Extracción D

Existen muchos kits de extracción basados en la tecnología de columna. El elegido para este estudio, el kit E.Z.N.A., combina las propiedades de uniones reversibles a ácidos nucleicos de la matriz HiBind® con la rapidez y versatilidad de las columnas para eliminar polisacáridos, polifenoles y otros inhibidores enzimáticos de los tejidos de planta lisados. Es muy sencillo de manipular y el tiempo requerido por muestra es de 20 minutos. Con este kit fue posible detectar fitoplasmas tanto de vinca como de viña, aunque no se incluyó ni mercaptoetanol ni RNAsa en el tampón de aislamiento. El kit E.Z.N.A. no es más rápido que otros métodos de extracción utilizados en este estudio, pero no requiere componentes tóxicos (fenol, cloroformo o alcohol isoamílico) en ningún paso de la extracción del DNA ni de la purificación; además la inclusión de mercaptoetanol en el tampón de aislamiento es opcional.

CONCLUSIONES

La combinación de la extracción con el kit E.Z.N.A. y la amplificación utilizando Ready-to-Go-PCR Beads es un procedimiento rápido y efectivo para la detección de fitoplasmas a partir de cantidades pequeñas de tejido de viña. Este procedimiento tiene una ventaja significativa respecto a otros publicados previamente ya que no se requiere nested-PCR (BERTACCINI, 1996) y no se utilizan reactivos tóxicos. La técnica se ha adoptado para el trabajo rutinario en el Laboratorio de Sanidad Vegetal (Generalitat de Catalunya), donde también se utiliza para la detección de fitoplasmas en frutales de pepita, frutales de hueso, olivo, arboles y arbustos forestales y, por supuesto, en especies hortícolas (GARCÍA-FIGUERES *et al.*, 2000).

AGRADECIMIENTOS

A Dr. D. Davies por sus sugerencias durante la elaboración de este trabajo, a Nuria Somoza (LabClinic) por el suministro de kits de extracción E.Z.N.A. y la cesión para testar el termociclador utilizado en este estudio, a Amparo Laviña y Asumptió Batlle (IRTA, Cabrils) por las muestras de vinca inoculadas con stolbur, a Josep Rahola por las muestras de viña. Este estudio fue financiado por una beca Interegional concedida a J. Rahola y J. Serra para el "Control y prevención de la flavescència dorada" de la Comunidad Europea-Generalitat de Catalunya.

ABSTRACT

MARTÍN, M.P.; TORRES, E.: Evaluation of methods based on PCR for the detection of the phytoplasma causing "flavescence dorée" disease in grapevines.

Four DNA extraction methods and two PCR protocols for the detection of the "flavescence dorée" phytoplasma in grapevines were investigated. Periwinkle leaves inoculated with "Stolbur", another phytoplasma frequent in grapevines, were included in this study to check how the differences between the leaf tissues affect the extraction and the detection of the phytoplasma. In both amplification protocols the primers fU5/rU3 were used to amplify a part of the 16S rDNA. No products were visualised regardless of the extraction protocol from any of the symptomatic leaves from the "flavescence dorée" infected grapevine using the standard PCR protocol. However, three of the four extraction methods successfully amplified phytoplasma DNA from the symptomatic grapevine leaves to be detected using Ready-To-Go PCR Beads (Pharmacia-Biotech). The combination of E.Z.N.A, a commercial kit designed to extract DNA from plants, and direct amplification with the Ready-To-Go PCR Beads was the fastest and most reliable procedure (from the eight tested) for the detection of phytoplasma from grapevines. This procedure does not require the use of nested PCR. All extraction methods combined with any of the amplification protocols allowed detection of phytoplasma in all the periwinkle samples.

Key words: DNA extraction, 16 rDNA amplification, Stolbur, phytoplasma detection.

REFERENCIAS

- 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 rDNA gene. *Phytopathology* **82**(8): 828-832.
- AVINENT, L. & LLACER, G., 1994: Detección de fitoplasmas en frutales mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). *Invest. Agrar.: Fuera de Serie* **2**: 201-205.
- AVINENT, L. & LLACER, G., 1995: El "stolbur" del tomate: detección en España mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). *Bol. San. Veg. Plagas* **21**: 417-423.
- AVINENT, L.; LLACER, G.; ALMACELLAS, J. & TORA, R., 1997: Pear decline in Spain. *Plant Pathology* **46**: 694-698.
- BATLLE, A.; LARRUE, J.; CLAIR, D.; DAIRE, X.; BOUDON-PADIEU, E. & LAVIÑA, A., 1995: Identificación del fitoplasma asociado al Bois Noir de la viña en España. *Phytoma* **68**: 40-44.
- BERTACCINI, A.; MURARI, E.; VIBIO, M.; DANIELLI, A.; DAVIS, R.E.; BORGIO, M.; CONSOLARO, R. & SANCASSANI, G.P., 1996: Identificazione molecolare dei fitoplasmi. *L'Informatore Agrario* **20/96**: 55-59.
- BOUDON-PADIEU, E., 1996: Jaunisses à phytoplasmes de la vigne. Diagnostic, épidémiologie, et développement des recherches. *C.R. Acad. Agric. Fr.* **82**: 5-20.
- COUSIN, M.T., 1995: Phytoplasmes et phytoplasmoses. *Agronomie* **15**: 245-264.
- DAIRE, X.; BOUDON-PADIEU, E.; BERVILLE, A.; SCHNEIDER, B. & CAUDWELL, A., 1992: Cloned DNA probes for detection of grapevine Flavescence dorée mycoplasma-like organism (MLO). *Ann. appl. Biol.* **121**: 95-103.
- DAIRE, X.; CLAIR, D.; LARRUE, J.; BOUDON-PADIEU, E. & CAUDWELL, A., 1993: Diversity among mycoplasma-like organisms inducing grapevine yellows in France. *Vitis* **32**: 159-163.
- DENG, S.J. & HIRUKI, C., 1991: Amplification of 16S rRNA genes from culturable and nonculturable molluscs. *J. Microbiol. Methods* **14**: 53-61.
- DOYLE, J.J. & DOYLE, J.L., 1990: Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus (Life Technol. Inc.)* **12**: 13-15.
- GARCÍA-FIGUERES, F.; MARTÍN, M.P. & TORRES, E., 2000: Detección de fitoplasmas en plantas leñosas sintomáticas en Cataluña. *X Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología*.
- KIRKPATRICK, B.C.; STENGER, D.C.; MORRIS, T.J. & PURCELL, A.H., 1987: Cloning and detection of DNA from nonculturable plant pathogenic mycoplasma-like organism. *Science* **238**: 197-200.
- LORENZ, K.-H.; SCHNEIDER, B.; AHRENS, U. & SEEMÜLLER, E., 1995: Detection of the apple proliferation and pear decline phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and nonribosomal DNA. *Phytopathology* **85**(7): 771-776.
- MARCONI, C.; RAGOZZINO, A. & SEEMÜLLER, E., 1997: Detection and identification of phytoplasmas in yellows-diseased weeds in Italy. *Plant Pathology* **46**: 530-537.
- MARTÍN, M.P.; HÖGBERG, N. & NYLUND, J.-E., 1998: Molecular analysis confirms morphological reclassification of the genus *Rhizopogon*. *Mycol. Res.* **102**(7): 855-858.
- MARTÍN, M.P. & TORRES, E., 1998: Evaluación de los métodos de extracción y amplificación del DNA por PCR para la detección de fitoplasmas en viña. *IX Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología*.
- RAHOLA, J.; REYES, J.; GIRALT, L.; TORRES, E. & BARRIOS, G., 1997: La flavescencia dorada en los viñedos del Alt Empordà (Girona). *Bol. San. Veg. Plagas* **23**: 403-416.
- SCHNEIDER, B.; AHRENS, U.; KIRKPATRICK, B.C. & SEEMÜLLER, E., 1993: Classification of plant-pathogenic mycoplasma-like organisms using restriction-site analysis of PCR-amplified 16S rDNA. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 519-527.
- SMART, C.D.; SCHNEIDER, B.; BLUMQUIST, C.L.; GUERRA, L.J.; HARRISON, N.A.; AHRENS, U.; LORENZ, K.H.; SEEMÜLLER, E. & KIRKPATRICK, B.C., 1996: Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of the 16S-23S rRNA spacer region. *Appl. Environ. Microbiol.* **62** (8): 2988-1993.
- WEISING, K.; NYBOM, H.; WOLFF, K. & MEYER, W., 1995: DNA fingerprinting in plants and fungi. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- WHITING, M.F.; CARPENTER, J.C.; WHEELER, Q.D. & WHEELER, W.C., 1997: The *Strepsiptera* problem: Phylogeny of the holometabolous insect orders inferred from 18S and 28S ribosomal DNA sequences and morphology. *Syst. Biol.* **46**: 1-68.

(Recepción: 5 abril 2001)
(Aceptación: 20 abril 2001)