

Caracterización molecular de los fitoplasmas del grupo Apple proliferation asociados a los síntomas de escoba de bruja en Retama

E. TORRES, S. BOTTI, S. PALTRINIERI, M.P. MARTÍN, A. BERTACCINI

Desde hace 4 años, se ha observado, en toda la franja costera de Cataluña, que arbustos de *Spartium junceum*, tanto espontáneos como ornamentales, presentan una enfermedad caracterizada por formaciones en escobas de bruja y decaimiento. Los síntomas pueden afectar a la totalidad de la planta o sólo a algunas ramas. El síntoma de mayor importancia es la escoba de bruja que se desarrolla a partir de la yema axilar. Las plantas afectadas se secan y, en ocasiones, mueren en pocos años. Recientemente, en Italia se han asociado estos síntomas a la presencia de fitoplasmas del grupo "Apple proliferation". En este trabajo se describen los métodos moleculares ("nested" PCR, RFLP y secuenciación) que han permitido caracterizar los fitoplasmas detectados en arbustos de retama sintomáticos en Cataluña. Los fitoplasmas detectados en *S. junceum* de España son molecularmente indistinguibles de otros fitoplasmas del grupo 16SrX ("apple proliferation") y pertenecen al subgrupo D.

E. TORRES: Laboratorio de Sanidad Vegetal, Generalitat de Catalunya, Via Circulació Norte Tramo VI, 08004 Barcelona. e-mail: aetorgu@gencat.net
S. BOTTI, S. PALTRINIERI, A. BERTACCINI: DiSTA, Patologia Vegetale, University of Bologna, Via Filippo Re 8, 40126 Bologna, Italy. e-mail: bertaccini_a@biblio.cib.unibo.it
M.P. MARTÍN: Real Jardín Botánico, CSIC, Plaza de Murillo 2, 28014 Madrid. e-mail: maripaz@ma-rjb.csic.es

Palabras clave: *Spartium junceum*, grupo 16SrX, filogenia, PCR, RFLP, secuenciación.

INTRODUCCIÓN

La retama (*Spartium junceum*) es una planta espontánea con amplia distribución en Cataluña. En los últimos 4 años, en toda la franja marítima se ha observado una enfermedad caracterizada por formaciones en escoba de bruja, brotación anticipada y decaimiento. La enfermedad afecta a un gran número de plantas en las tres provincias costeras de Cataluña (Barcelona, Girona y Tarragona), y se presenta tanto en plantas espontáneas como en aquellas plantadas en

áreas urbanas con fines ornamentales. Los síntomas pueden afectar a toda la planta, aunque lo más habitual es observarlo sólo en algunas ramas. El síntoma más importante es la formación de escobas de bruja que se desarrollan a partir de una yema axilar (Fig. 1 y Fig. 2). En algunas ocasiones, el tallo que presenta la escoba de bruja, hace doblar la rama debido a su peso excepcional. Las plantas afectadas se secan y, pueden morir en pocos años. La brotación de la rama con escoba de bruja se adelanta, empezando hacia el mes de febrero (Fig. 3) y, durante la



Figura 1. Retama con escobas de bruja desarrolladas a partir de yemas axilares.



Figura 2. Detalle de una rama con formación de escoba de bruja.

primavera, cuando la retama ha florecido completamente, estas ramas afectadas aparecen con mayor número de hojas pero sin ninguna flor (Fig. 4).

En Italia se detectó y se describió una enfermedad similar (RAGOZZINO *et al.*, 1980), identificándose mediante métodos moleculares dos fitoplasmas distintos en las plantas sintomáticas, uno del grupo AP (16SrX) ("Apple proliferation") y otro del grupo EY (16SrV) ("Elm yellows"), molecu-

laramente indistinguible del "alder yellows"; aunque el segundo se detectó en una frecuencia muy inferior (MARCONE *et al.*, 1996; ALIOTO *et al.*, 2000). En retamas de Cataluña (TORRES *et al.*, 2002), se identificó como agente causal de la sintomatología descrita un fitoplasma del grupo "Apple Proliferation" (16 SrX), subgrupo D. El objetivo de este trabajo es describir los métodos que han permitido caracterizar estos fitoplasmas aislados de las ramas de las retamas afectadas con escoba de bruja.



Figura 3. Brotación anticipada de la rama afectada.



Figura 4. Rama afectada sin flores en época de plena floración.

Tabla 1. Muestras de retama examinadas

Referencia	Provincia; localidad	Síntomas en huésped	Resultado de PCR	Identificación del fitoplasma
T500	Girona; Tossa	Escoba de bruja	+	16SrX-D
T501	Girona; Tossa	Escoba de bruja	+	16SrX
T502	Girona; Tossa	Sin síntomas	-	
T652	Barcelona; Llobregat	Sin síntomas	-	
T701&	Barcelona; Collserola	Escoba de bruja	+	16SrX-D
T706	Barcelona; Montjuïc	Escoba de bruja	+	16SrX
T707	Barcelona; Montjuïc	Escoba de bruja	+	16SrX
T980	Barcelona; Collserola	Escoba de bruja	+	16SrX
T981	Barcelona; Collserola	Escoba de bruja	+	16SrX
T982	Barcelona; Collserola	Sin síntomas	-	
T983	Barcelona; Collserola	Escoba de bruja	+	16SrX
T984	Barcelona; Collserola	Sin síntomas	-	
T1026	Barcelona; Vallès	Escoba de bruja	+	16SrX

& Secuencia publicada en el GenBank con el número de acceso AJ430067.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material

En la Tabla 1 se indican las muestras de retama examinadas en el presente trabajo, con síntomas de escoba de bruja y asintomáticas.

Extracción de DNA

El DNA total de las muestras de la Tabla 1 se aisló a partir de tejidos frescos usando un método combinado: primero, para concentrar los fitoplasmas (AHRENS & SEEMÜLLER, 1992), se realizó una extracción con PGB (phytoplasma grinding buffer) y, posteriormente, se utilizó E.Z.N.A. Plant Mini-Prep Kit (Omega-Biotech, Doraville, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante, sin añadir RNasa ni mercaptoetanol, tal y como se indica en Martín y Torres (2001). El DNA se resuspendió en 100 µl de agua Milli-Q estéril.

La mayoría de los aislamientos de DNA control (Tabla 2) pertenecen a la colección de fitoplasmas micropropagados, que se

mantiene en el laboratorio de DiSTA, Universidad de Bologna (BERTACCINI *et al.*, 2000). Para el aislamiento de DNA control se siguió el procedimiento de cloroformo-fenol descrito por PRINCE *et al.* (1993) y se conservó en tampón TE a -20 °C.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las reacciones de amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se realizaron por dos métodos distintos.

Método A. La presencia o ausencia de fitoplasmas en las muestras de *S. junceum* detalladas en la Tabla 1, se ensayaron mediante una doble amplificación ("nested-PCR"): una primera reacción de amplificación con la pareja de iniciadores externos P1 (DENG & HIRUKI, 1991) /P7 (SCHNEIDER *et al.*, 1995), seguida por una segunda amplificación en la que se utilizó como DNA molde 0.5 µl de la primera amplificación y los iniciadores internos U5 /U3 (LORENZ *et al.*, 1995). Todas las amplificaciones se realizaron mediante reacciones individuales con Ready-to-Go™ PCR Beads (Amersham-Phar-

Tabla 2. Aislados de fitoplasmas utilizados como controles positivos para identificar el fitoplasma asociado a la retama con síntomas de escoba de bruja mediante análisis de los patrones de digestión con enzimas de restricción (RFLP)

Aislado del fitoplasma	Acrónimo	Huesped original	Origen	Grupos *
Pear decline	PD	Peral	Germany	16SrX-C
Apple proliferation	AP-15	Manzano	Italy	16SrX-A
European stone fruit yellows	ESFY	Ciruelo	Germany	16SrX-B
Chrysanthemum yellows	CHRY	Chrysanthemum	Germany	16SrI-A
Sandal spike disease	SAS	Sándalo	India	16SrI-B
Clover phyllody	KVM	Trébol	France	16SrI-C
Molière disease	MOL	Cerezo	France	16SrXII-A
Elm yellows	EY	Olmo	USA	16SrV-A
Rubus stunt	RuS	<i>Rubus</i>	Italy	16SrV-E
Alder yellows	AIY	Aliso	Italy	16SrV-C
Jujube witches' broom	JWB	Jujube **	China	16SrV-B
Flavescence dorée	FD-D	Vid **	Italy	16SrV-D
Green Valley X disease	GVX	Melocotonero	USA	16SrIII-A
Clover phyllody	KVI	Trébol	Italy	16SrIII-B

* los grupos se han designado de acuerdo con la literatura (Lee *et al.*, 1998; Davis & Dally, 2001).

** aislados procedentes del huésped original.

macia Biotech) de acuerdo con el protocolo de Martín y Torres (2001) en un termociclador Techne DNA (modelo Progene). Los parámetros de los ciclos fueron 40 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 seg, hibridación a 55°C durante 1 min, y extensión a 72°C durante 1 min; con una extensión final a 72°C durante 10 min. Para activar la polimerasa de las PCR Beads, previo a los ciclos de la PCR, se llevó la reacción a 94°C durante 5 min. En cada experimento se utilizaron controles negativos (sin DNA), para comprobar la pureza de los reactivos y las posibles contaminaciones. Después de la amplificación, el DNA se visualizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio e iluminación mediante UV.

Método B. Se efectuó también una “nested PCR”. Como DNA molde se utilizaron todos los aislados de la Tabla 1 y los controles de la Tabla 2 diluidos con agua desionizada estéril hasta la concentración final de 20 ng/μl. El DNA extraído de plantas asinto-

máticas y agua estéril fueron los controles negativos.

La primera amplificación, se realizó en un volumen total de 25 ml que contenía 2.5 μl de tampón 10X PCR, 200 μM de cada dNTP, 0.4 μM de la pareja de iniciadores (P1/P7), 0.625 U de Taq polimerasa (Poly-med, Firenze, Italia, EU) y 1 μl de DNA molde. Los parámetros de los 35 ciclos de amplificación fueron los siguientes: 1 min de desnaturalización a 94 °C (2 min en el primer ciclo), 2 min hibridación a 50 °C y 3 min (10 min en el último ciclo) a 72 °C para la extensión de los iniciadores. Se utilizó un termociclador Biometra (Uno Thermoblock, Gottingen, Germany, EU).

Para la segunda amplificación se emplearon los productos de la primera PCR diluidos en agua destilada estéril (1: 30) y se siguieron las mismas condiciones que para la amplificación con P1/P7. Se hicieron distintas amplificaciones: con los iniciadores generales R16F2/R2 y con R16(V)F1/R1 y R16(X)F1/R1, parejas específicas para los grupos 16SrV y 16SrX respectivamente (LEE

et al., 1994; 1995). Después de la segunda amplificación, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% con una alícuota de 6 µl de cada muestra y se visualizó el DNA tras tinción con bromuro de etidio e iluminación UV.

Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)

De todas las amplificaciones positivas (presencia de fitoplasma) obtenidas con los iniciadores U5/U3, se digirieron 200 ng de DNA por separado con los enzimas de restricción *SspI* y *RsaI* (Fermentas, Lithuania) durante un mínimo de 16 horas siguiendo las instrucciones del fabricante. Una cantidad similar de los amplímeros obtenidos mediante los iniciadores R16F2/R2, a partir de las muestras de retama T-500 y T-701, así como de las 14 muestras control detalladas en la Tabla 2, se sometieron a análisis de RFLP, tras la digestión con *TruI*, *Tsp509I*, *RsaI*, *BfaI*, *ThaI* y *SspI* (Fermentas, Lithuania) durante un mínimo de 16 horas siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los patrones de restricción se visualizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 5% teñidos con bromuro de etidio y se compararon a partir de las fotografías obtenidas de los geles.

Secuenciación de los productos de PCR y análisis filogenético

El amplímero obtenido, mediante los iniciadores P1/P7, del aislado de retama T-701 se purificó mediante Concert Rapid™ PCR Purification System (GibcoBRL, Life Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las dos cadenas de DNA se secuenciaron en un ABI Prism Model 377 (PE Applied Biosystem, CA, USA) con los iniciadores P1, P6 (DENG & HIRUKI, 1991), P4 y P7 (SCHNEIDER *et al.*, 1995) utilizando Big Dye terminator chemistry. La secuencia consenso se obtuvo mediante el programa "Sequence Navigator™ Sequence Comparison" y se depositó en el Banco Genético

(EMBL) con el número de acceso AJ430067. Esta secuencia se comparó, mediante el programa SEQAPP, con 45 secuencias homólogas depositadas en el EMBL (Tabla 3). La secuencia de *Acholeplasma palmae* (L33734) se consideró como grupo externo en los análisis filogenéticos.

El programa PAUP 4.0b4a (Phylogenetic Program Using Parsimony) (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip/software.html>) se utilizó en los análisis de parsimonia. La robustez de las ramas se estimó a partir de 10000 replicas heurísticas ("bootstrap") utilizando la opción "fast stepwise-addition".

RESULTADOS

Mediante la "nested-PCR" con los iniciadores P1/P7 y U5/U3 (método A), todas las muestras de retama sintomáticas dieron positivas (Tabla 1). El amplímero tuvo una longitud de aproximadamente 900 bp. Los análisis RFLP a partir de los patrones obtenidos con los enzimas de digestión *SspI* y *RsaI* indicaron la presencia de fitoplasmas del grupo 16SrX. De las extracciones de DNA de las muestras asintomáticas no se visualizaron amplímeros.

Con los iniciadores específicos para fitoplasmas del grupo 16SrX (R16(X)F1/R1), se amplificaron las extracciones de DNA de las muestras de *S. junceum* sintomáticas y de los controles específicos del grupo (datos no mostrados). Sin embargo, con los iniciadores específicos del grupo 16SrV (R16(V)F1/R1), únicamente se obtuvieron amplificaciones a partir de los controles de dicho grupo.

Con los iniciadores P1/P7 y R16F2/R2, se visualizó el producto de PCR específico de fitoplasma (1250 pb) de los aislados analizados (T-500 y T-701). Los patrones de RFLP (Fig. 5) obtenidos a partir de las digestiones de los amplímeros (R16F2/R2) de los dos aislados, indicaron que los fitoplasmas detectados en los *S. junceum* de Cataluña pertenecen al grupo 16SrX ("apple proliferation") subgrupo D. En particular, de los seis

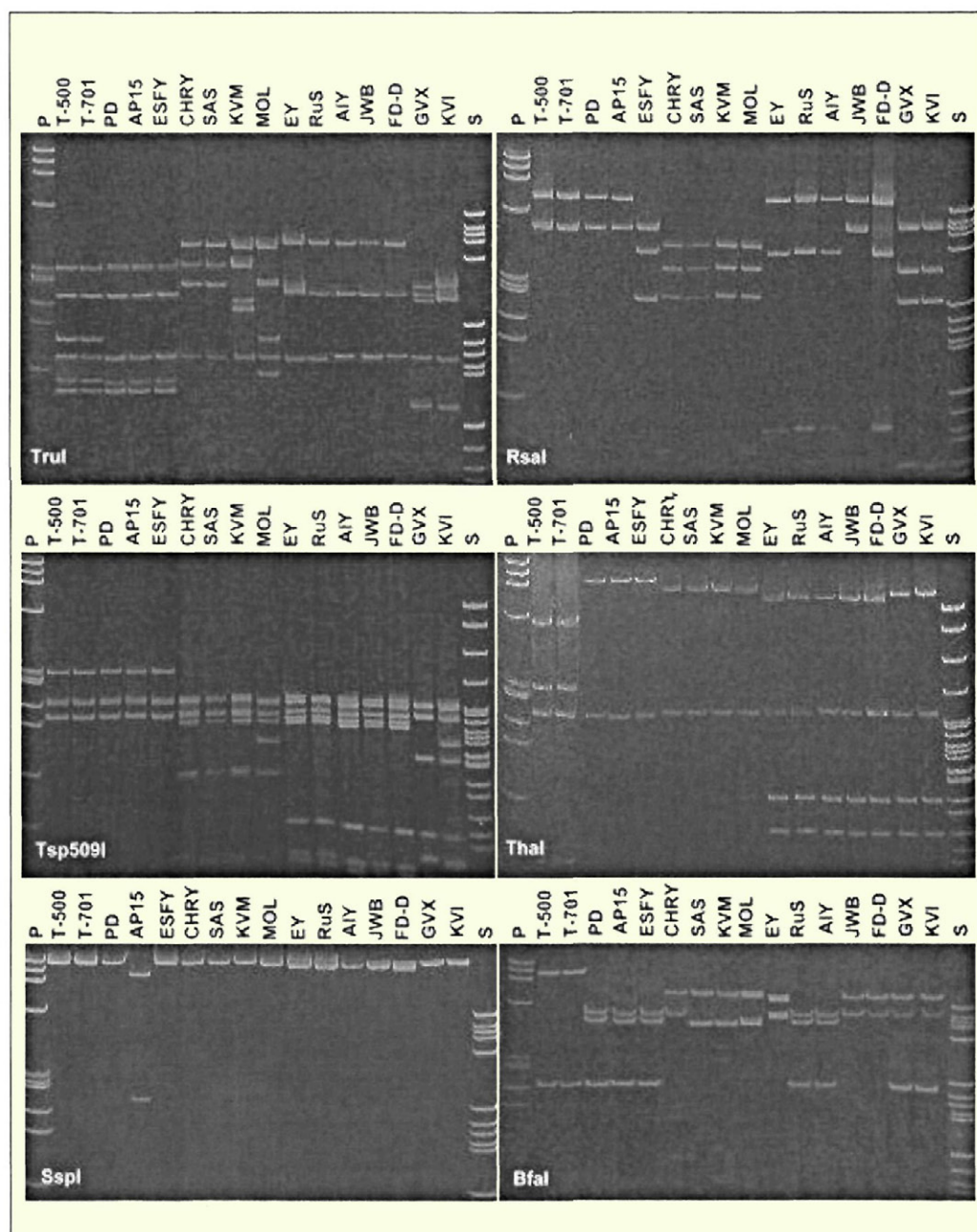


Figura 5. Geles de poliacrilamida (5%) mostrando los patrones de digestión de los aislamientos T-500 y T-701 de *S. junceum* y los 14 aislamientos mencionados en la tabla 2, con los enzimas de restricción *TruI*, *RsaI*, *Tsp509I*, *Thal*, *SspI* y *BfaI*. Carril 18, marcador S, pBR322 digerido con *MspI*, tamaño de los fragmentos en pares de bases de arriba a abajo 622, 527, 404, 307, 242, 238, 217, 201, 190, 180, 160, 147, 123, 110, 90, 76, 67, 34, 26, 15, 9. Carril 1, marcador P, λ X174 digerido con *HaeIII*, tamaño de los fragmentos en pares de bases de arriba a abajo: 1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118, y 72.

Tabla 3. Aislados de fitoplasmas considerados en el análisis filogenético

Número de acceso	Aislados de fitoplasmas	Acronimo	Origen	Grupos 16Sr DNA *
AJ430067	Spartium witches' broom	SparS	EU, España	16SrX-D
AB026155	Gerbera phyllody	GPP	Japón	nd
AF028813	Chinese pigeon pea w. broom	CPPWP	Taiwan	16SrII
AF056095	Sugarcane yellows	SCY	Sudáfrica	nd
AF105315	Hibiscus witches' broom	HiWB	Brasil	16SrXV
AF173558	Clover yellow edge	CYE	Canada	16SrIII-B
AF189215	Ash yellows	ASHY	USA, NY	16SrVII-A
AF200718	Cactus phytoplasma	CaP	México	nd
AF222063	Aster yellows	AY	USA, Md	16SrI-B
AF222064	Tomato big bud	BB	USA, Ak	16SrI-A
AF228052	Brinjal little leaf	BLL	India	nd
AF228053	Periwinkle little leaf	PerLL	Bangladesh	nd
AF248956	Loofah witches' broom	LfWB	Taiwan	16SrVIII-A
AF248957	Pigeon pea witches' broom	PPWB	USA, Fl	16SrIX-A
AF248958	Apple proliferation	AP	EU, Italia	16SrX-A
AF248959	Stolbur	STOL	Serbia	16SrXII-A
AF248960	Mexican periwinkle virescence	MPV	México	16SrXIII-A
AF248961	Bermudagrass white leaf	BGWL	Tailandia	16SrXIV-A
AF305240	Jujube witches' broom	JWB	China	16SrV-B
AJ243044	Strawberry green petal	SGP	Australia	nd
AJ243045	Strawberry lethal yellows	Sly	Australia	nd
AJ289192	Stilosantes little leaf	StiLL	Australia	nd
AJ295330	Cocky apple w. broom	CAPWB	Nueva Zelanda	nd
AY029540	ESFY from apricot	ESFYA	EU, Austria	16SrX-B
M86340	Western aster yellows	SAY	USA, California	16SrI-B
U15442	Witches' broom of lime	WBDL	Península arábiga	16SrII-B
U89378	Rape phyllody	RP	República checa	16SrI-B
X76560	Flavescence dorée	FD	EU, Francia	16SrV-C
X83431	Brinjal little leaf	BLL	India	nd
X83432	Faba bean phyllody	FBP	Sudan	16SrII-C
X83438	Cirsium phytoplasma	CirP	EU, Alemania	nd
X92869	Spartium witches'-broom	SparI	EU, Italia	16SrX-D
X95706	Australian grapevine yellows	AGY	Australia	16SrXII-B
Y08173	Phytoplasma sp. papaya	PpP	Australia	nd
Y10095	Papaya dieback	PpDB	Australia	nd
Y10096	Papaya mosaic disease	PMD	Nueva Zelanda	nd
Y10097	Papaya yellow crinkle	PpYC	Nueva Zelanda	nd
Y11933	European stone fruit yellows	ESFYCZ	República checa	16SrX-B
Y15863	Phytoplasma sp. strain Boll	BoLL	Australia	nd
Y15865	Phytoplasma sp. strain Gall	GaLL	Australia	nd
Y15866	Phytoplasma sp. strain Vill	ViLL	Australia	nd
Y16387	Alder yellows	ALY	EU, Italia	16SrV-C
Y16390	Italian alfalfa witches' broom	IAWB	EU, Italia	16SrII-E
Y16392	Pear decline	PD	EU, Alemania	16SrX-C
Y16394	Peach yellow leafroll	PYLR	USA, California	nd
Y16395	Rubus stunt	RuS	EU, Italia	16SrV-E

nd, grupo no disponible;

*, los grupos se han indicado siguiendo las clasificaciones de Lee *et al.*, 1998, Montano *et al.*, 2001; Davis & Dally, 2001.

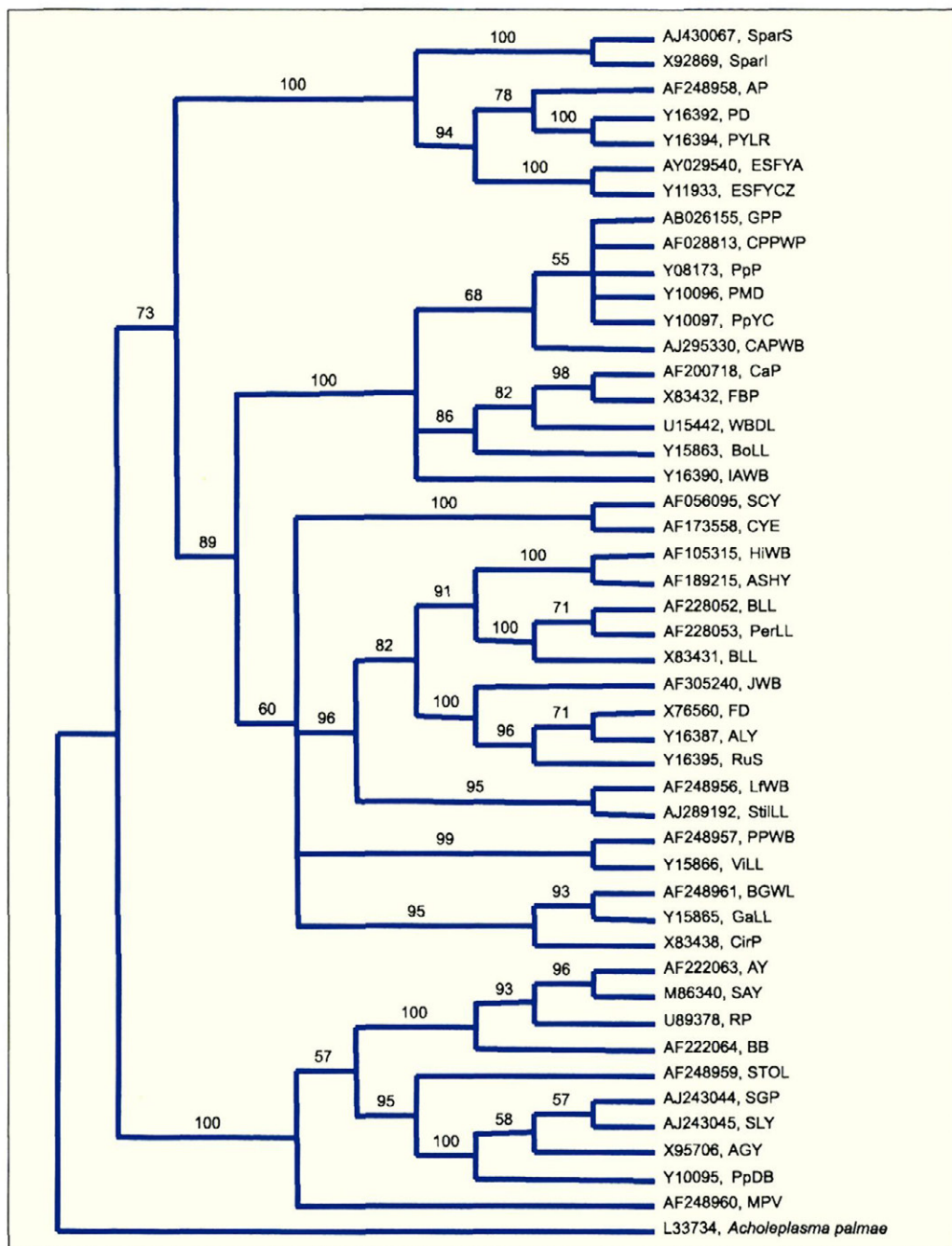


Figura 6. Árbol filogenético construido por análisis de parsimonia y búsqueda heurística de las secuencias del gen rDNA 16S y la región espaciadora de 46 aislados de fitoplasmas y *Acholeplasma palmae* como grupo externo. La longitud de las ramas es proporcional al número de las transformaciones de los caracteres. Los valores de "bootstrap" (confianza) se indican sobre las ramas.

enzimas de restricción empleados, *RsaI*, *Tsp509I* y *SspI* no diferenciaron los fitoplasmas de la retama de otros pertenecientes al grupo 16SrX, mientras que *TruI*, *ThaI* y *BfaI* distinguieron claramente los fitoplasmas de *S. junceum* como del subgrupo 16SrX-D.

La secuencia de 16S (rDNA) y la región espaciadora de la muestra T-701 se alineó en 1842 posiciones con las secuencias homólogas mencionadas en la Tabla 3, incluido el grupo externo. Bajo el criterio de parsimonia, 432 caracteres fueron informativos. Se obtuvieron treinta árboles igualmente parsimoniosos (longitud= 1380; CI= 0.5826; HI= 0.4174). El árbol del consenso estricto (Fig. 6) mostró que la secuencia del fitoplasma de *S. junceum* se agrupa en el clado de "Apple proliferation" (16SrX o AP) con un nivel de confianza del 100 % ("bootstrap").

DISCUSIÓN

Los análisis comparativos de RFLP entre los fitoplasmas detectados mostraron que los fitoplasmas que se encuentran en diferentes áreas de Cataluña son genéticamente homogéneos y pertenecen al subgrupo 16SrX-D (LEE *et al.*, 1998). El análisis filogenético confirmó los resultados obtenidos por RFLP: la secuencia del aislado español T-701 se agrupa en el mismo clado que todos los miembros del grupo 16SrX con un 100% bootstrap. Esta secuencia es casi idéntica a la secuencia X92869 obtenida por MARCONE *et al.* (1996), a partir de uno de los dos fitoplasmas detectados en *S. junceum* en Italia, donde también se asociaron a esta enfermedad fitoplasmas del grupo 16SrV. Los fitoplasmas del grupo 16SrX afectan sobretudo a frutales y, en particular, los del subgrupo 16SrX-B (ESFY) son responsables de la enfermedad de frutales de hueso caracterizada por brotación anticipada y desajustes vegetativos. En Cataluña aparece de manera simultánea la brotación anticipada en frutales de hueso y en retamas infectados por fitoplasmas.

Esta enfermedad es un problema fitopatológico importante en la región mediterránea

donde *S. junceum* es una planta espontánea característica del paisaje. En Italia se ha publicado una enfermedad similar de *S. junceum* asociada a fitoplasmas, donde a menudo se ha detectado infección mixta de fitoplasmas (MARCONE *et al.*, 1996; ALIOTO *et al.*, 2000). Las plantas con síntomas se encuentran ampliamente distribuidas en Cataluña donde, estos últimos años, se ha observado un incremento en el número de retamas afectadas. La mayor pérdida es la muerte de las plantas afectadas, aunque también se debe considerar un problema la devaluación estética causada por la presencia de escobas de bruja y de ramas secas, sobre todo si las plantas se encuentran en jardines o parques públicos.

Hasta el momento los fitoplasmas del subgrupo D del grupo 16SrX sólo se han detectado en retamas. Los fitoplasmas del grupo 16SrX asociados a frutales de pepita y de hueso pertenecen a otros subgrupos, por lo que, en principio, las retamas con síntomas de escoba de bruja no representan un problema para los frutales de la región.

Las enfermedades producidas por fitoplasmas se transmiten principalmente por insectos vectores. En la actualidad se desconoce si el fitoplasma asociado a *S. junceum* puede ser transmitido por insectos del género *Psylla*, tal y como sucede mayoritariamente con fitoplasmas que pertenecen al mismo grupo (JENSEN *et al.*, 1964; CARRARO *et al.*, 1998; FRISINGHELLI *et al.*, 2000). Para prevenir la futura difusión de esta enfermedad sería necesario estudiar su transmisión y su epidemiología.

Los métodos moleculares aquí detallados permiten diagnosticar con precisión los fitoplasmas asociados a retamas. Tanto el análisis RFLP como el filogenético muestran la agrupación de estos fitoplasmas con los del grupo 16SrX. El subgrupo 16SrX-D se concluye por los patrones obtenidos por RFLP con *TruI*, *ThaI* y *BfaI*, o bien, por la elevada similitud de la secuencia con otras secuencias del mismo subgrupo. Por la rapidez y bajo costo del análisis, recomendamos en

análisis de rutina PCR-RFLP con los tres enzimas mencionados.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Dr. Carmine Marcone, Dipartimento di Biologia, Difesa

e Biotecnologie Agro-Forestali, Universidad de Basilicata, Potenza, Italia por su amable aportación de los aislados RuS y AIY. Al Sr. Josep M^a Vives (Servei Sanitat Vegetal, DARP, Generalitat de Catalunya) y al Sr. Josep M^a Riba por la aportación de algunas muestras utilizadas en este estudio.

ABSTRACT

TORRES E., S. BOTTI, S. PALTRINIERI, M.P. MARTÍN, A. BERTACCINI: 2003. Molecular characterization of apple proliferation phytoplasma group associated to witches' broom in Spanish broom. *Bol. San. Veg. Plagas*, **29**: 265-275.

Since 1999 witches' broom and decline diseases have been observed in *Spartium junceum*, both spontaneous and ornamental shrubs located in urban areas, in all the sea-side regions of Catalonia (Northeastern Spain). The symptoms may affect the whole plant or few branches. The witches' broom developed from axillar buds is the most important symptom. Affected plants end up turning very dry, and eventually die in a few years. These symptoms have been recently associated in Italy to the presence of apple proliferation phytoplasma group. In this work the molecular methods (nested PCR, RFLP and sequencing) that allow the characterization of the phytoplasmas detected in symptomatic Spanish Broom shrubs from Catalunya are described. The phytoplasmas detected are molecularly undistinguishable from others of the 16SrX group (apple proliferation), subgroup D.

Keywords: *Spartium junceum*, 16SrXgroup, phylogeny, PCR, RFLP, sequencing.

REFERENCIAS

- ALIOTO, D., MARCONE, C., RAGOZZINO, E. 2000. Scopazzi e fasciazioni della ginestra (*Spartium junceum*). *Informatore fitopatologico* **4**, 61-64.
- AHRENS, U., SEEMÜLLER, E. 1992. Detection of plant pathogenic mycoplasmalike organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology* **82**, 828-832.
- BERTACCINI, A., CARRARO, L., DAVIES, D., LAIMER DA CÂMARA MACHADO, M., MARTINI, M., PALTRINIERI, S., SEEMÜLLER, E. 2000. Micropropagation of a collection of phytoplasma strains in periwinkle and other host plants. *Congress of IOM, ACROS Fukuoka, Japan, July 14-19*, 101.
- CARRARO, L., OSLER, R., LOI, N., ERMACORA, P., REFATTI, E. 1998. Transmission of European stone fruit yellows phytoplasma by *Cacopsylla pruni*. *Journal of Phytopathology* **80**, 233-239.
- DAVIS, R.E., DALLY, E.L. 2001. Revised subgroup classification of group 16SrV phytoplasmas and placement of Flavescence dorée-associated phytoplasmas in two distinct subgroups. *Plant Disease* **85**, 790-797.
- DENG, S.J., HIRUKI, C. 1991. Genetic relatedness between two nonculturable mycoplasmalike organisms revealed by nucleic acid hybridization and polymerase chain reaction. *Phytopathology* **81**, 1475-1479.
- FRISINGHELLI, C., DELAITI, L., GRANDO, M.S., FORTI, D., VINDIMIAN, M.E. 2000. *Cacopsylla costalis* (Flor 1961), as vector of apple proliferation in Trentino. *Journal of Phytopathology* **148**, 425-431.
- JENSEN, D.D., GRIGGS, W.H., GONZALES, C.Q., SCHNEIDER, H. 1964. Pear decline virus transmission by pear psylla. *Phytopathology* **54**, 1346-1351.
- LEE, I-M., GUNDERSEN, D.E., HAMMOND, R.W., DAVIS, R.E. 1994. Use of mycoplasmalike 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., BERTACCINI, A., VIBIO, M., GUNDERSEN, D.E. 1995. Detection of multiple phytoplasmas in perennial fruit trees with decline symptoms in Italy. *Phytopathology* **85**, 728 - 735.
- LEE, I-M., GUNDERSEN-RINDAL, D.E., DAVIS, R.E., BARTOSZYKI, 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* **48**, 1153-1169.
- 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., SCHNEIDER, B., LAUER, U., SMART, C.D., SEEMÜLLER, E. 1996. Genetic characterization and classification of two phytoplasmas associated with *Spartium* witches' broom disease. *Plant Disease* **80**, 365-371.
- MARTÍN M. P., TORRES E, 2001. Evaluación de métodos basados en la PCR para la detección del fitoplasma asociado a la enfermedad de la Flavescencia dorada en vid. *Boletín de Sanidad Vegetal-Plagas* **27**, 67-74.
- MONTANO, H.G., DAVIS, R.E., DALLY, E.L., HOGENHOUT, S., PIMENTEL, J.P., BRIOSO, P.S.T. 2001. "Candidatus Phytoplasma brasiliense", a new phytoplasma taxon associated with hibiscus witches' broom disease. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51**, 1109-1118.
- PRINCE, J.P., DAVIS, R.E., WOLF, T.K., LEE, I.-M., MOGEN, B.D., DALLY, E.L., BERTACCINI, A., CREDI, R., 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. *Phytopathology* **83**, 1130-1137.
- RAGOZZINO, A., CRISTINZIO, M. 1980. Presenza di micoplasmi in eucalipti (*Eucalyptus* sp.) affetti da giallume ed in ginestre *Spartium junceum* L.) con scopazzi. Atti convegno sulla produzione e patologia delle piante arboree, forestali ed ornamentali. Ed. Regione Lombardia, Milano, 96.
- SCHNEIDER, B., SEEMÜLLER, E., SMART, C.D., KIRKPATRICK, B.C. 1995. Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas. In: Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology. Vol. 2, 369-380. S. Razin and J.G. Tully eds., Academic Press, New York.
- TORRES, E., BOTTI, S., PALTRINIERI, S., MARTIN, M.-P., BERTACCINI, A. 2002. First report of *Spartium* witches' broom disease in Spain. *New Disease Reports* (<http://www.bspp.org.uk/ndr>), vol.5.

(Recepción: 1 julio 2002)

(Aceptación: 31 octubre 2002)