



Universitat de Lleida

Epidemiologia dels fitoplasmes dels fruiters de fruita dolça de la vinya a la Península Ibèrica: identitat genètica, hostes, vectors, cicles i control

Jordi Sabaté Rabella

<http://hdl.handle.net/10803/385359>

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

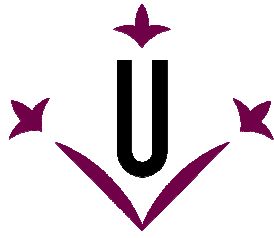
WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

UNIVERSITAT DE LLEIDA
DEPARTAMENT DE PRODUCCIÓ VEGETAL I CIÈNCIA FORESTAL

**EPIDEMIOLOGIA DELS FITOPLASMES DELS FRUITERS DE FRUITA
DOLÇA I DE LA VINYA A LA PENÍNSULA IBÈRICA**
Identitat genètica, Hostes, Vectors, Cicles i Control



Tesi Doctoral
JORDI SABATÉ RABELLA
Lleida, Febrer 2016



Universitat de Lleida



Universitat de Lleida

Departament de Producció Vegetal i Ciència Forestal

**EPIDEMIOLOGIA DELS FITOPLASMES DELS FRUITERS DE FRUITA
DOLÇA I DE LA VINYA A LA PENÍNSULA IBÈRICA**

Identitat genètica, Hostes, Vectors, Cicles i Control

Lleida, Febrer de 2016

Memòria presentada per Jordi Sabaté Rabella per optar al títol de Doctor
Enginyer Agrònom per la Universitat de Lleida

Directora:
Dra. Assumpció Batlle Durany

IRTA-Cabrils

Codirector:
Dr. Vicente Medina Piles

Universitat de Lleida

Un bon viatger no té plans fixos
ni s'encaparra en arribar enlloc en concret
un bon artista permet
que la seva intuïció el guiï on pertoqui
un bon científic es lliura de conceptes
i manté la seva ment oberta a allò que realment és

Lao Tse

AGRAÏMENTS

Gràcies a tots els companys del departament de Protecció Vegetal Sostenible de l'IRTA de Cabrils, molt especialment a Assumpció Batlle i Amparo Laviña, pilars bàsics d'aquesta tesi, sense la confiança i els coneixements de les quals, no hauria estat possible. També als companys Cinta Calvet, Amèlia Camprubí, Jordi Luque, Joan Pera, Xavier Parladé, José Aramburu, Olga Jurado, Montse Prat i Victoria Barnés, pels seus coneixements, consells, ajuda i bon humor.

Gràcies també en general, a tot el departament de producció vegetal de l'ETSEA de Lleida i concretament a M^a Angels Achón pels seus consells i bon humor, i molt especialment a Vicente Medina pels seus coneixements, ajuda i guia científica.

Cal agrair també l'ajuda i col·laboració de Ester Torres i Joan Bech al Laboratori de Sanitat vegetal del DAAM, i de tots els tècnics de les ADV's i cooperatives de Catalunya que m'han ajudat, especialment Andreu Vila i Pau Moragas.

També dono les gràcies als tècnics col·laboradors dels serveis de protecció dels vegetals de les comunitats d'Aragó, Navarra, La Rioja, País Basc, Astúries i València per l'ajuda en la selecció de parcel·les i els mostrejos.

Finalment, i per sobre de tot, agrair als meus pares, n'Eulàlia i en Jordi, i al meu germà, en Narcís, per encoratjar la meva curiositat i ganes de coneixement.

INDEX	7
I Resums	9
II Introducció general	15
III Objectius	47
IV Capítols	
Capítol 1. Epidemiologia de ‘ <i>Candidatus Phytoplasma prunorum</i> ’	51
Incidence and distribution of ‘ <i>Ca. P. prunorum</i> ’ and its vector <i>Cacopsylla pruni</i> in Spain: an approach to the epidemiology of the disease and the role of wild <i>Prunus</i> .	53
Capítol 2. Epidemiologia de ‘ <i>Candidatus Phytoplasma mali</i> ’	75
Incidence and distribution of ‘ <i>Ca. P. mali</i> ’ and its potential vectors in apple orchards of northern Spain	77
Capítol 3: Estudi i identificació de ‘ <i>Candidatus Phytoplasma pyri</i> ’ causant del “Peach yellow leaf roll” (PYLR) en presseguer	97
First report of ‘ <i>Ca. P. pyri</i> ’ causing Peach yellow leaf roll (PYLR) in Spain	99
Capítol 4: Epidemiologia de ‘ <i>Candidatus Phytoplasma solani</i> ’	103
Incidence of Bois Noir phytoplasma in different viticulture regions of Spain and Stolbur isolates distribution in plants and vectors	105
V Discussió general	123
VI Conclusions	131
VII Referències	135
Annex I Índex de figures	155
Annex II Índex d’abreviatures	156
Annex III Classificació dels fitoplasmes	157

I RESUM

Els fitoplasmes causen grans pèrdues als conreus de la fruita dolça i de la vinya i representen una amenaça futura encara més important. L'objectiu bàsic d'aquesta tesi ha estat establir la distribució i la incidència dels diferents fitoplasmes afectant aquests conreus al nord de la Península Ibèrica i conèixer els seus cicles patològics per a incidir-hi, reduint-ne l'expansió i els danys.

Per a realitzar aquesta tesi s'han prospectat símptomes en plantes i insectes potencials vectors de fitoplasmes de manera estandarditzada. La selecció de parcel·les s'ha realitzat pensant a cobrir un ampli rang de condicions agro-ecològiques, varietats/espècies, zones productores i graus d'afectació al màxim de representatives. Les mostres de plantes (conreades i salvatges), i d'insectes potencialment vectors identificats, s'han analitzat mitjançant mètodes moleculars (PCR) per a determinar les seves taxes d'infecció per fitoplasmes. També s'ha determinat la identitat d'aquests fitoplasmes fins al nivell de soca mitjançant, seqüenciació i RFLP.

Els resultats mostren que els principals fitoplasmes dels fruiters i la vinya estan àmpliament distribuïts i causen danys importants a moltes de les zones estudiades.

'*Candidatus Phytoplasma mali*' i el seu vector principal *Cacopsylla picta* no estan presents a Catalunya i estan àmpliament distribuïts a la Cornisa cantàbrica.

'*Ca. P. pyri*' és endèmic a moltes zones productores de pera i actualment està causant un brot de PYLR en presseguer que pot expandir-se i causar danys importants.

'*Ca. P. prunorum*' causa moltes pèrdues al Baix Llobregat, la Ribera d'Ebre i Extremadura, i està present de manera anecdòtica a l'Aragó i la Comunitat valenciana. Les poblacions del seu vector segueixen el mateix patró de distribució i es relacionen amb la presència d'hostes salvatges.

'*Ca. P. solani*' és el principal fitoplasma que afecta la vinya a l'Estat espanyol, està àmpliament distribuït, juntament amb el seu vector *Hyalesthes obsoletus*, a la Vall de l'Ebre i a Catalunya. La seva incidència és elevada a finques de La Rioja, el Somontano i Navarra i afecta especialment a les varietats Garnatxa i Chardonnay. L'aïllat majoritari és el *Tuf-b* relacionat amb *Convolvulus arvensis* com a hoste del fitoplasma i el vector.

I RESUMEN

Los fitoplasmas causan grandes pérdidas en los cultivos de la fruta dulce y de la vid, y representan una amenaza futura todavía más importante. El objetivo básico de esta tesis ha sido establecer la distribución y la incidencia de los diferentes fitoplasmas afectando a estos cultivos en la Península Ibérica además de conocer sus ciclos patológicos para incidir en ellos i reducir su expansión y daños.

Para realizar esta tesis se han prospectado síntomas en plantas y potenciales insectos vectores de fitoplasmas de manera estandarizada. La selección de parcelas se ha realizado para cubrir un amplio rango de condiciones agroecológicas, variedades/especies, zonas productoras y grados de afectación al máximo de representativos. Las muestras de plantas (cultivadas y silvestres) y de insectos potencialmente vectores identificados, se han analizado mediante métodos moleculares (PCR) para determinar los porcentajes de infección por fitoplasmas. También se ha determinado la identidad de estos fitoplasmas hasta el nivel de cepa mediante secuenciación y RFLP. Los resultados muestran que los principales fitoplasmas de los frutales i de la vid están ampliamente distribuidos y causan daños importantes en muchas de las zonas estudiadas.

‘*Candidatus Phytoplasma mali*’ y su vector *Cacopsylla picta* no están presentes en Cataluña y están ampliamente distribuidos en la Cornisa Cantábrica.

‘*Ca. P. pyri*’ es endémico en muchas zonas productoras de pera y actualmente está causando un brote de PYLR en melocotonero que puede expandirse y causar daños importantes.

‘*Ca. P. prunorum*’ causa muchas pérdidas en el Baix Llobregat, la Ribera d’Ebre y Extremadura, y está presente de forma anecdótica en Aragón y la Comunidad Valenciana. Las poblaciones de su vector siguen el mismo patrón de distribución y se relacionan con la presencia de huéspedes salvajes.

‘*Ca. P. solani*’ es el principal fitoplasma que afecta a la vid en España, está ampliamente distribuido juntamente con su vector *Hyalesthes obsoletus* en el Valle del Ebro y Cataluña. Su incidencia es elevada en fincas de La Rioja, el Somontano y Navarra y afecta especialmente a las variedades Garnacha y Chardonnay. El aislado mayoritario es el *Tuf-b* relacionado con *Convolvulus arvensis* como huésped del fitoplasma y el vector.

I ABSTRACT

The phytoplasmas are causing great losses and represent an important threat for the future of the fruit trees and vine cultivation. The main objective of this thesis was to establish the distribution and the incidence of the different phytoplasmas affecting these crops in the north of the Iberian Peninsula, with the aim to know the pathological cycles to intervene and reduce the expansion and the damages.

This thesis was carried out surveying the phytoplasmas symptoms and the potential insect vectors in a standardized procedure. The plots were chosen to cover a wide range of agro-ecological conditions, varieties/species, production areas and incidence levels. The samples of wild and cultivated plants and identified potential insect vectors, were analysed by PCR to detect phytoplasmas and to establish its infection rates. The isolates identity was also determined by RFLP and sequencing.

The results showed that the main phytoplasmas of fruit trees and vines in Europe are causing important losses and are wide distributed in the studied areas.

‘*Candidatus Phytoplasma mali*’ and its main vector *Cacopsylla picta* were wide distributed in the Atlantic regions, but were no present in Catalonia.

‘*Ca. P. pyri*’ is endemic in the main pear production areas. Nowadays is causing an outbreak of PYLR on peach trees that could spread and cause important losses.

‘*Ca. P. prunorum*’ is causing important losses in the Baix Llobregat, Ribera d’Ebre and Vegas Altas areas. This phytoplasmas is present but with very low incidence in Lleida, Aragon and Valencia production areas. The populations of its vector *C. pruni* followed the same distribution and are related to the presence of wild and naturalized hosts.

‘*Ca. P. solani*’ is the main phytoplasma affecting vineyards in Spain, is wide distributed together with its vector *Hyalesthes obsoletus* in the Ebro valley and Catalonia. The incidence was high in La Rioja, Somontano and Navarre areas, especially in the varieties Garnatxa and Chardonnay. The main isolate was *Tuf-b* related to *Convolvulus arvensis*.

II INTRODUCCIÓ

2.1. Els conreus d'arbres de fruita dolça i la vinya, generalitats

Es consideren com a conreus de fruita dolça a les diverses espècies de rosàcies conreades en climes temperats per al consum dels fruits. La majoria d'espècies d'aquests fruiters pertanyen als gèneres *Prunus* (drupàcies o fruiters de pinyol), *Malus* i *Pyrus* (pomàcies o fruiters de llavor). Tots formen conreus principalment de regadiu amb un grau elevat d'intensificació, on s'han de realitzar inversions importants en la preparació del terreny, suport al cultiu i material vegetal. Aquesta inversió condiciona un període d'amortització relativament llarg en el qual la plantació s'ha de mantenir productiva (Baldini, 1992). Per altra banda, el conreu de la vinya és un conreu tradicionalment de secà establert arreu del món. Sol ser un conreu menys intensificat que els fruiters, ja que rep molt menys suports productius. Malgrat que aquesta inversió sigui més reduïda, gran part la constitueix el material vegetal. A més la mort de ceps és un problema greu, ja que la longevitat de les vinyes és un factor important en la producció de vins d'alta qualitat i la creació de valor afegit (Togores, 2002).

La vinya i els fruiters són de gran importància a tots els països mediterranis, on constitueixen un dels principals sectors exportadors i la principal font d'ingressos per a moltes zones rurals amb poques alternatives econòmiques. Aquests conreus, ocupen una superfície a Espanya de més d'un milió d'hectàrees, de les quals 950.000 ha corresponen a vinyes i 200.000 ha de fruiters no cítrics o fruita dolça. Dins els fruiters, l'espècie més conreada és el presseguer/nectarina (*Prunus persica* (L) (Batch, 1812)) amb 83.000 ha, seguit de la pomera (*Malus domestica* (Borkh, 1803) amb 35000 ha i el cirerer (*P. avium* (Linnaeus, 1755)) amb 32.000 ha. Si es té en compte que aproximadament la producció mitjana per hectàrea de fruiters és d'uns 20.000 kg/ha, ens podem fer una idea del valor econòmic total que representa el sector i de la seva importància (ESYRCE, 2014). Només les exportacions espanyoles de fruita dolça l'any 2014 van sumar un valor total de 1.100 milions d'euros, essent el préssec i la nectarina les més exportades amb 720 milions d'euros (FEPEX, 2014). La importància del conreu de la vinya és encara més gran, ja que té més superfície i amb la seva collita s'elabora

un producte, el vi, d'alt valor afegit. Les exportacions espanyoles de vins l'any 2014 van arribar fins als 2.500 milions d'euros, essent el primer exportador mundial en volum i el tercer en valor total (OEMV, 2014).

Els conreus de la fruita dolça i la vinya són de gran importància tant econòmica com social a les zones de climes mediterranis i temperats, essent qualsevol factor que els afecti i en minvi els rendiments molt rellevant. Un dels problemes més greus per aquests conreus són les malalties sense tractaments curatius o preventius com les fitoplasmosi. Aquestes malalties disminueixen la qualitat i quantitat de la collita i la duració del període productiu, obligant en molts casos a l'arrencada i el canvi per un cultiu de rendibilitat menor (Agrios, 2013). En molts casos, la reducció de la producció i la mort generalitzada d'arbres és tant important, que no permet ni tant sols l'amortització de les inversions. Tenint en compte les pèrdues que causen els fitoplasmes i la presència endèmica de molts d'ells a la Península Ibèrica, es fa evident el seriós perill que representen. Aquest risc es veurà incrementat per la possible arribada de nous fitoplasmes i vectors potencials pels efectes del canvi climàtic i la globalització. Donats el pocs coneixements sobre l'epidemiologia, hostes, vectors i cicles patològics de molts fitoplasmes a la Península Ibèrica, queda palesa la necessitat d'aprofundir en la recerca sobre aquests patògens per tal d'optimitzar les estratègies i medis de lluita.



Figura 1. Parcel·la de presseguers afectada i arrencada.

2.2. Els fitoplasmes

2.2.1. Generalitats, filogènia i taxonomia

Els fitoplasmes, antigament anomenats "MLO's" del terme anglès "Mycoplasma-like organisms", són procariotes fitopatògens sense paret cel·lular pertanyents al regne *Eubacteria*, phylum *Tenericutes* i classe *Mollicutes*. Les principals característiques dels fitoplasmes venen condicionades per aquesta manca de paret, que els confereix sensibilitat a la lisi osmòtica, absència de precursors de peptidoglicans, resistència a la penicil·lina, sensibilitat a les tetraciclines, pleomorfisme, i elasticitat cel·lular (Bertaccini i Duduk, 2009). Són paràsits d'organismes eucariotes, i tenen el genoma tant reduït que requereixen factors de creixement complexos que no poden sintetitzar com ara àcids grassos, aminoàcids, purines, pirimidines, vitamines, esterols, ATPs i transportadors (Hoshi *et al.*, 2007; Ohisma *et al.*, 2013). Per aquests requeriments tan específics de factors de creixement, i la sensibilitat a petites variacions de pressió osmòtica, no s'han pogut cultivar fins ara en medi axènic. Queda així per complir un dels postulats de Koch-Pasteur per a ser considerats formalment com a espècie. Recentment s'ha citat el cultiu *in vitro* d'algun d'ells, però no n'ha quedat demostrada la viabilitat de les colònies (Contaldo *et al.*, 2012). Amb la implementació de la PCR ("Polymerase chain reaction") en l'estudi filogenètic de seqüències gèniques de proteïnes ribosòmiques, la posició d'aquests microorganismes va quedar ben definida, i a partir de 1993, el terme fitoplasma, es va acceptar i generalitzar (ICSBSTM, 1993). Actualment els fitoplasmes es designen com a '*Candidatus Phytoplasma spp.*' fins que es puguin aïllar i cultivar degudament (Schneider *et al.*, 1993; IRPCM, 2004).

Els fitoplasmes poden ser esfèrics o filamentosos. Les formes esfèriques es troben als llocs de fort creixement, com ara els vasos conductors del pecíol i el nervi central de la fulla, i tenen entre 175 i 400 nm de diàmetre. Les formes filamentoses es troben als teixits conductors madurs i poden arribar fins a 1700 nm de llargada (Arora i Sinha, 1988). Molt probablement, provenen a través d'un procés d'evolució regressiva, de bacteris Gram positius afins als clostridis (*Bacillus subtilis*). Aquesta evolució ha comportat l'eliminació gradual de seqüències nucleotídiques i de gens, i per això no poden sintetitzar molts factors de creixement (Razin, 2007). El genoma més petit entre

els completament seqüenciats correspon a '*Ca. P. mali*' amb 602 kb, i el més gran a '*Ca. P. australiense*' amb 880 kb (Kube *et al.*, 2008; Kube *et al.*, 2012). Dins l'àmbit dels mol·licuts, s'ha determinat que els organismes més pròxims als fitoplasmes pertanyen al gènere *Acholeplasma* (Tran-Nguyen *et al.*, 2007). Amb l'anàlisi del gen ribosomal 16S altament conservat a tots els procariotes, s'ha pogut determinar que l'homologia amb altres mol·licuts és molt alta. L'homologia entre els diferents fitoplasmes està entre un 88% i un 99%, confirmant el seu origen monofilètic. En estudis de variabilitat genètica s'ha pogut observar que a menor rang d'hostes i vectors, menor variabilitat presenta un fitoplasma (Kube *et al.*, 2012).

Per a poder assignar a un organisme el rang de "*Candidatus Phytoplasma*", cal conèixer la seqüència nucleotídica completa del gen 16S i obtenir la identificació d'un morfotipus mitjançant una sonda específica (IRPCM, 2004). Si es classifica taxonòmicament en un rang inferior al de gènere, s'utilitzen les diferències i similituds de les seqüències del gen ribosomal 16S, de la regió espaiadora intergènica rRNA 16S-23S, de l'operó per a la proteïna ribosomal *rpl 22* i *rps 19*, i del gen del factor d'elongament EF-Tu (gen *tuf*). Amb aquesta informació, Wei *et al.* (2007) han proposat 30 grups i 31 '*Candidatus Phytoplasma*' (Annex 4). Aquesta i les anteriors classificacions han estat polèmiques, ja que no són totalment congruents en l'associació que s'estableix entre els tipus de fitoplasmes, les malalties associades i els símptomes. Per això alguns autors han proposat que també s'incloguin altres criteris com el rang d'hostes, la distribució geogràfica i els vectors, ja que un mateix agent causal, pot produir malalties diferents (IRPCM, 2004; Duduk i Bertaccini, 2011). Aquest és el cas de "*Ca. P. pyri*", "*Ca. P. mali*" i "*Ca. P. prunorum*", que segons el criteris moleculars no podrien ser considerats fitoplasmes diferents, ja que tenen més del 97% de similitud en el gen 16S, però presenten diferències clares d'hostes, vectors i en altres zones gèniques no ribosòmiques com els gens *Imp*, *SecY*, *Pnp* i *Ace* (Seemüller i Schneider, 2004; Danet *et al.*, 2011). Un altre factor que en complica la classificació, el diagnòstic, i l'atribució a un agent causal concret, és la facilitat amb la que es produeixen infeccions múltiples (Lee *et al.*, 1998), que possibiliten la recombinació (Danet *et al.*, 2011).

2.2.2. Simptomatologia i detecció

Molts dels símptomes causats pels fitoplasmes són comuns als d'altres malalties vasculares. Durant molts anys han estat l'única eina que es tenia per a diagnosticar les malalties associades a fitoplasmes, amb totes les imprecisions i errors que això comportava. La simptomatologia està influenciada per l'espècie i varietat de la planta, l'evolució de la malaltia, l'estat sanitari i nutricional previ a la infecció, el patró i la soca del fitoplasma (Kison i Seemüller, 2001). Els principals símptomes causats pels fitoplasmes són: virescències, fil·lòdies, fil·lomanies, esterilitat de flors, escombres de bruixa, fals cribat, elongació anormal d'entrenusos, desfasament fenològic, fruits petits i amb poc contingut de sucres, nanisme, manca de lignificació, esgrogueïments, enrogiment, enrotllament i caiguda de fulles prematura, pèrdua de la dominància apical, creixements en roseta, necrosi del teixit floemàtic, decaïments, incompatibilitat i brotacions anticipades. Aquests símptomes es presenten normalment combinats, units a falta de vigor, clorosi, i gairebé sempre distribuïts d'una manera irregular a la planta. (Lee i Gundersen, 2000; Bertaccini i Duduk, 2009). Molts dels símptomes són la conseqüència de desajustos fisiològics i hormonals, la qual cosa fa pensar, que els fitoplasmes són capaços d'interferir en els processos metabòlics vegetals (Gibb, 1999; Oshima *et al.*, 2013).



Figura 2. *P. halepensis* amb proliferació causada per 'Ca. P. pini'

La detecció dels fitoplasmes ha estat sempre una tasca difícil, degut a que no es poden cultivar *in vitro* i a la poca especificitat dels símptomes que indueixen. Pel seu diagnòstic, inicialment s'utilitzaven plantes indicadores i tècniques de microscòpia, posteriorment proves immunològiques (ELISA), i actualment tècniques de genètica molecular com la PCR, Dot-Blot, RFLP, PCR quantitativa i combinacions entre elles (Bertolini *et al.*, 2007; Weintraub i Jones, 2010). Les tècniques més utilitzades actualment pel seu diagnòstic són la PCR i la PCR quantitativa. Normalment s'usen en ambdues tècniques iniciadors en regions conservades del gen ribosòmic 16S, ja siguin generals per a tots el fitoplasmes o específics del grup o del fitoplasma en concret (Schneider *et al.*, 1993; Weintraub i Jones, 2010). Darrerament s'està començant a utilitzar la tècnica LAMP (amplificació d'ADN a temperatura constant) mitjançant "kits" i protocols que tenen molt poc requeriment d'equipaments (Bekele *et al.*, 2011).

2.2.3. Cicles i transmissió

Els fitoplasmes són transmesos a través del material vegetal infectat utilitzat en la propagació vegetativa com ara empelts, divisions de mata, bulbs, tubercles, rizomes, estolons i varetes autoarrelades. La seva via de transmissió natural són els insectes vectors pertanyents a l'ordre *Hemiptera* i majoritàriament als subordres *Archaeorrhyncha* (=Fulgoromorpha, família Cixidae), *Clypeorrhyncha* (=Cicadomporpha, famílies Cicadellidae i Cercopidae) i *Sternorrhyncha* (família Psyllidae). (Weintraub i Beanland 2006; Forero, 2008). La transmissió mitjançant insectes vectors és persistent, circulativa i propagativa. Quan un insecte s'alimenta del floema d'una planta infectada reté el patogen al sistema digestiu, travessa la barrera intestinal, colonitza l'hemolimfa i es multiplica, fins que la concentració a les glàndules salivals esdevé suficient per a fer-lo infectiu de per vida. Les plantes quedaran infectades quan l'insecte introdueixi els fluids salivals al floema en alimentar-se (Fletcher *et al.*, 1998). El principal factor fisiològic que determina si un insecte és vector d'una espècie de fitoplasma concreta, és la barrera del tracte intestinal (Wayadande, 1995; Fletcher, 1999).

El període de latència en els fitoplasmes, el temps que transcorre des que l'insecte adquireix el patogen fins que té capacitat d'inocular-lo, és normalment d'uns vint dies.

El període d'adquisició va de dues hores, a tres o quatre dies. Els fitoplasmes aparentment no causen malalties als insectes amb qui mantenen una relació més aviat sapròfita o fins i tot simbiòtica. Aquestes relacions són molt complexes i suggereixen un llarg període de coevolució. En estudis recents s'ha determinat que les plantes infectades produeixen substàncies atractives per als insectes vectors. Les plantes infectades per fitoplasmes també augmenten les taxes reproductives d'aquests vectors, reduint la producció de substàncies defensives contra insectes fitòfags com l'àcid jasmònic (Fletcher *et al.*, 1998; Weintraub i Beanland 2006; Gross, 2011; Sugio *et al.*, 2011).

El principal factor que permet a un insecte esdevenir vector d'un tipus de fitoplasma són les seves plantes hoste, ja que a més de tenir capacitat potencial de transmissió, s'ha d'alimentar de plantes que hostatgin el patogen. Normalment un determinat insecte és el vector específic d'un fitoplasma, i a la vegada és monòfag respecte la planta hoste del mateix fitoplasma. També hi ha insectes polífags portadors d'un sol tipus de fitoplasma que provoquen diferents malalties a les diferents espècies de plantes de les que s'alimenten. Aquests insectes polífags també poden ser portadors de més d'un fitoplasma a la vegada (Lee *et al.*, 1994; Wilson *et al.*, 2007). Un cas típic són els principals fitoplasmes dels fruiters que pertanyen al grup 16SrX. Aquests fitoplasmes formen part d'un patosistema quasi tancat on l'insecte vector s'alimenta i transmet el fitoplasma a un únic gènere de plantes, que a la vegada són els hostes exclusius del patogen. Això porta a una variabilitat genètica molt petita, però ben diferenciada entre els diferents fitoplasmes (Kube *et al.*, 2008). El cas contrari és el dels fitoplasmes pertanyents al grup 16SrI (AY) "Aster yellows", on trobem tot un gradient de petites diferències genètiques entre els diferents subgrups i múltiples espècies d'insectes vectors que transmeten el fitoplasma a moltes espècies vegetals diferents. Als Estats units s'ha comprovat la transmissió de fitoplasmes d'aquest grup mitjançant una trentena d'espècies de cicadèl·lids a més d'un centenar d'espècies vegetals, la qual cosa facilita l'horitzontalitat en l'intercanvi genètic i la variabilitat genètica del grup (Kube *et al.*, 2012).

Molts grups de fitoplasmes solen ser transmesos per insectes d'una mateixa família, per exemple *Cicadellidae* i no *Cixidae* o *Psyllidae*. Les espècies vectorials i llurs aptituds

alimentàries (monofàgia, oligofàgia o polifàgia) determinaran el rang de plantes hoste i la diversitat genètica del fitoplasma. Normalment la especificitat més alta en el patosistema es dona entre el vector i el fitoplasma (Fletcher *et al.*, 1998; Weintraub i Beanland 2006). Quan l'insecte vector adquireix el fitoplasma en forma de nimfa se solen produir alts percentatges d'individus infectius. Altres vegades no cal que el vector tingui com a hoste preferent la planta infectada i amb unes quantes picades ja pot esdevenir infectiu després del període de latència. Les plantes espontànies juguen en molts casos un paper molt important en la transmissió i l'epidemiologia dels fitoplasmes, ja que sovint estan infectades i constitueixen la principal font d'inòcul de la malaltia i de cria de l'insecte (Borroto-Fernández *et al.*, 2007; Weintraub i Jones, 2010).



Figures 3, 4, 5. D'esquerra a dreta i de dalt a baix: *Euscelidius variegatus* (Hemiptera, Cicadellidae), *Cacopsylla pulchella* (Hemiptera, Psyllidae) i *Philaenus spumarius* (Hemiptera, Aphrophoridae).

2.3. Els principals fitoplasmes dels fruiters a Europa: “Apple Proliferation Group” o grup AP (16SrX)

2.3.1. Generalitats, detecció i caracterització

Els principals fitoplasmes dels fruiters a Europa pertanyen al grup X dels fitoplasmes (16SrX) o “Apple proliferation group” (grup AP). Aquests fitoplasmes són: ‘*Ca. P. mali*’(16SrX-A), ‘*Ca. P. prunorum*’ (16SrX-B) i ‘*Ca. P. pyri*’(16SrX-C), causants de la proliferació de la pomera (AP), els esgrogueïments europeus dels fruiters de pinyol (ESFY) i el decaïment del perer (PD) respectivament. Aquestes malalties afecten als gèneres *Malus*, *Prunus* i *Pyrus* respectivament, i són transmeses per les psíl·les específiques de cada un dels gèneres (Lorenz i Seemüller, 2004). Un altre fitoplasma d’aquest grup és “*Ca. P. spartii*” 16SrX-D, causant de les escombres de bruixa de la ginesta (Torres *et al.*, 2002).

Les malalties induïdes per aquest grup de fitoplasmes causen pèrdues molt importants i són de quarantena a diferents nivells. El primer mètode de diagnòstic va ser mitjançant varietats molt sensibles com a indicadores: Decana de Comici per al PD, Golden per a AP i Bergeron per a ESYF (Llácer, 1999). Avui en dia es detecten rutinàriament per tècniques moleculars: PCR, “nested”-PCR i PCR quantitativa. La detecció de fitoplasmes per PCR, tot i ser molt sensible, pot presentar algun fals negatiu en plantes llenyoses, degut a la irregular distribució del fitoplasma i la fluctuació estacional en la concentració, amb la qual cosa el resultat queda molt condicionat per la modalitat i l’època de mostreig. La millor època per a detectar fitoplasmes en llenyoses sol ser a la tardor abans de la caiguda de fulla i utilitzant el teixit floemàtic de rams i pecíols (Jarausch *et al.*, 1999a). També la presència d’inhibidors de la PCR en insectes i plantes llenyoses, poden ser factors limitants per al diagnòstic (John *et al.*, 1992; Weintraub i Jones, 2010). La PCR quantitativa presenta menys problemes de contaminacions i és més sensible, a més de possibilitar la quantificació d’ADN. Els iniciadors majoritàriament utilitzats per a la detecció dels fitoplasmes del grup X són per a fitoplasmes en general: fP1/rP7 (Deng i Hiruki, 1991; Smart *et al.*, 1996) i en “nested” PCR fU3/rU5 i R16f2N/ R16r2N (Lee *et al.*, 1994; Lorenz *et al.*, 1995) i fO1/rO1

(Lorenz *et al.*, 1995) general per al grup X. També es disposa d'iniciadors per a PCR quantitativa específics, del grup X o universals (Torres *et al.*, 2005; Hodgetts, *et al.*, 2009; Christensen *et al.*, 2013) per a PCR quantitativa.

2.3.2. Els insectes vectors del grup AP (16SrX): *Cacopsylla* spp.

Els psíl·lids són una família d'hemípters pertanyents al subordre *Sternorrhyncha* i a la superfamília *Psylloidea*. La seva aparença és la de petites cigales saltadores amb una mida compresa entre 1.5 i 4.5 mm i unes extremitats posteriors molt desenvolupades. Les nimfes completen els seu cicle en pocs hostes primaris, passant per 5 estadis ninfals. Ocasionalment, els adults es poden alimentar d'altres espècies vegetals, però mai no hi ponen els ous, ja que les nimfes tenen una gran especificitat d'hoste (Hodkinson i White, 1979). Són insectes d'importància agronòmica tant pels danys directes com a plaga, com per la transmissió de fitoplasmes. Un exemple de plaga són les psíl·les del perer: *Cacopsylla pyri* (Linnaeus, 1758) (*Hemiptera*, *Psyllidae*), *C. pyricola* (Foerster, 1848) (*Hemiptera*, *Psyllidae*), repartint-se la importància agronòmica a Europa i Amèrica respectivament (Davies *et al.*, 1992; Carraro *et al.*, 1998b). Altres psíl·lids vectors que no són plaga, són *C. melanoneura* (Foerster, 1848) (*Hemiptera*, *Psyllidae*) i *C. picta* (Foerster, 1848) (*Hemiptera*, *Psyllidae*) per a 'Ca. P. mali' (Frisinghelli *et al.*, 2000; Tedeschi *et al.*, 2002) i *C. pruni* (Scopoli, 1763) (*Hemiptera*, *Psyllidae*), per a 'Ca. P. prunorum' (Carraro *et al.*, 1998a)

La identificació dels psíl·lids es fa mitjançant caràcters morfològics, com ara la venació alar, les antenes i principalment la genitèlia externa dels mascles. Les claus dicotòmiques més utilitzades són les de Hodkinson i White (1979) i les de Ossianilsson (1992). No obstant, en moltes espècies dels gèneres *Cacopsylla* i *Trioza*, la identificació de femelles és força difícil, ja que les seves genitèlies són molt semblants. Actualment s'han posat a punt tècniques moleculars per a la diferenciació entre espècies, que fins i tot permeten la determinació de biotipus dins de la mateixa espècie. Aquesta identificació es pot fer mitjançant microsatèl·lits o mitjançant l'amplificació del gen *Its-2* (Peccoud *et al.*, 2013).

2.3.3. ‘*Candidatus Phytoplasma prunorum*’ (16SrX-B), l’agent causal dels ESFY (“European stone fruit yellows” o Esgroguèiments europeus dels fruiters de pinyol)

2.3.3.1. Generalitats, hostes i simptomatologia

La primera notícia dels ESFY es va tenir a França on Chabrolin (1924) va observar una alteració en albercoquers que anomenà apoplexia. Posteriorment, Goidanich (1933) va descriure la leptonecrosi de la prunera japonesa a Itàlia, i Sala (1935) també va descriure una síndrome semblant en pruneres japoneses al Baix Llobregat. Amb el nom d’ESFY (“European stone fruit yellows” o Esgroguèiments europeus dels fruiters de pinyol), es coneix tot un grup de malalties de les drupàcies, com ara la leptonecrosi de la prunera, els esgroguèiments del presseguer o l’enrotllament cloròtic de l’albercoquer. Amb l’aplicació d’eines de genètica molecular, es va determinar que eren malalties amb una etiologia comuna, el fitoplasma ‘*Ca. P. prunorum*’ (Lorenz *et al.*, 1994).



Figura 6. Rebrotos del patró *P. marianna* amb proliferacions i filimorfismes.

‘*Ca. P. prunorum*’ és un problema sanitari d’importància pel conreu dels fruiters de pinyol, i les malalties que provoca estan àmpliament distribuïdes per tot Europa i la Conca Mediterrània. Ha esdevingut un problema molt greu en albercoquer i prunera japonesa a moltes parts de França, Itàlia, Grècia i Espanya, condicionant-ne el conreu en

àrees endèmiques, i forçant-ne la substitució per espècies tolerants (Marcone *et al.*, 2010; Cielinska, 2011a; Stefek, 2012). A Espanya s'ha identificat la malaltia a l'Aragó, Catalunya, Múrcia, València i Extremadura, indicant que està àmpliament distribuïda (Llácer *et al.*, 1986, Laviña *et al.*, 2004; Torres *et al.*, 2004). La malaltia és endèmica al Baix Llobregat, presenta epidèmies cícliques a Múrcia i València, i està en progressió a Extremadura, on els últims anys s'han detectat noves plantacions de prunera japonesa i presseguer infectades (Sabaté *et al.*, 2015).



Figures 7 i 8. D'esquerra a dreta, apoplexia en *P. persica* i brotació anticipada en *P. salicina*.

'Ca. *P. prunorum*' pot infectar la majoria d'espècies del gènere *Prunus*, essent molt agressiu en albercoquer (*Prunus armeniaca* (Linnaeus, 1753)) i prunera japonesa (*Prunus salicina* (Lindl, 1830)). També afecta en menor mesura el presseguer i la nectarina (*Prunus persica*), la prunera europea (*Prunus domestica* (Linnaeus, 1753)), l'ametller (*Prunus dulcis* (Miller, 1758)), *P. serrulata* (Lindl, 1830) i *P. cerasifera* (Ehrh, 1785) (Giunchedi *et al.*, 1982; Lederer i Seemüller, 1992; Carraro *et al.*, 2004). En canvi hi ha espècies quasi totalment asimptomàtiques com ara *P. spinosa* (Linnaeus, 1753), *P. mahaleb* (Linnaeus, 1753) i molts híbrids (Jarausch *et al.*, 2000; Poggi-Pollini *et al.*, 2004). 'Ca. *P. prunorum*' també ha estat detectat en plantes no pertanyents al gènere *Prunus* com a *Fraxinus sp.*, *Rosa sp.* i *Celtis australis*, normalment sense símptomes o amb lleugers esgrogueïments (Jarausch *et al.*, 2001b).

La simptomatologia de les malalties induïdes per ‘*Ca. P. prunorum*’ és variable en relació a la sensibilitat de l’espècie, el portaempelt, la varietat, l’estat de maduresa de la planta, la pressió de successives reinfeccions, la virulència de la soca del fitoplasma i els condicionants agro-ecològics (Kison i Seemüller, 2001). En albercoquer i prunera japonesa, el símptoma més característic és el desfasament fenològic amb la brotació anticipada irregular de rams durant la parada vegetativa d’hivern. Posteriorment tota la planta esdevé afectada, donant-se decaïment general, i en un període de 3 a 5 anys la mort de l’arbre. Molts patrons sobreviuen a la mort de la varietat, fet que provoca l’aparició de rebrots massius a la soca, moltes vegades també amb símptomes. Un altre símptoma és l’apoplexia o col·lapse, que consisteix en la mort sobtada dels arbres just en brotar a la primavera sense haver manifestat cap alteració anterior (Morvan, 1977; Cielinska, 2011). En presseguer no se sol donar l’avançament de la vegetació i els símptomes són: clorosi, enrotllament de fulles, falta de vigor i en alguns casos apoplexia (Poggi-Pollini *et al.*, 2001).



Figura 9. Desfasament fenològic en *P. salicina*.

2.3.3.2. *Cacopsylla pruni*, vector de 'Ca. P. prunorum': cicles

El vector dels ESFY va ser identificat tardanament, ja que després de diverses deteccions i assajos amb diferents insectes (Llácer *et al.*, 1986; Lorenz *et al.*, 1994), l'any 1998 Carraro i col·laboradors en van demostrar la transmissió mitjançant el psíl·lid *C. pruni*. És un insecte no massa abundant, però àmpliament distribuït per tot Europa, Anatòlia, el Caucas i Sibèria. El seus hostes primaris són les plantes del gènere *Prunus*, principalment *P. spinosa*, *P. cerasifera* i *P. domestica*. També se'n troben sobre *P. armeniaca* i *P. insititia*, i en altres *Prunus* spp. com ara presseguer, cirerer i ametller, hi és molt rara (Jarausch *et al.*, 2001a, Labonne i Lichou, 2004; Thebaud *et al.*, 2006).

C. pruni té una generació l'any i hiverna en forma d'adult. Els adults hivernants (remigrants) arriben als *Prunus* spp. a finals d'hivern on s'alimenten i hi ponen els ous. Les nimfes es desenvolupen durant la primavera, apareixent els adults entre maig i juny, i marxant al juliol cap als seus refugis hivernals (emigrants) (Carraro *et al.*, 2001; Labonne i Lichou, 2004; Yvon *et al.*, 2004). Hivernen en coníferes que poden estar fins a 50 km del seus hostes primaris, a alçades entre 700-1300m. A l'hivern no es troben en coníferes pròximes al seus hostes primaris habituals, podent-se considerar que aquestes coníferes allunyades, no són només un refugi, sinó que són hostes secundaris quasi obligats (Carraro *et al.*, 2002; Thebaud *et al.*, 2009). Aquesta relativa poca abundància i el seu cicle, fan que la seva importància com a plaga (danys directes) sigui molt petita, i que tot l'interès agronòmic estigui centrat en la seva capacitat vectora dels ESFY (Poggi-Pollini *et al.*, 2004).



Figura 10. Genitàlia masculina de *C. pruni*.

En estudis genètics de les poblacions de *C. pruni* a diversos llocs d'Europa, s'ha arribat a la conclusió que hi ha diferents biotipus amb molt pocs heterozigots, la qual cosa porta a pensar, que la seva ecologia és prou diferent com per a que no hi hagi reproducció entre elles, i per tant no es pot descartar que siguin fins i tot espècies diferents. Per això també es pensa que cada biotipus pot tenir un paper diferent en la transmissió dels ESFY (Peccoud *et al.*, 2013). En estudis recents s'ha determinat que els individus remigrants són els més eficients en la transmissió, ja que tenen molt temps per a multiplicar el fitoplasma (Thebaud *et al.*, 2009). En assajos de transmissió fets per Jarausch (2008), es va aconseguir una taxa de transmissió del 25% mitjançant individus hivernants immigrants i només un 5% en nimfes i adults joves, tots ells efectivament portadors del fitoplasma sota condicions controlades. També hi ha indicis de conductes agregatives guiades per feromones i sons en les migracions (Gross, 2011).

Figura 10. Genitèlia masculina de *C. pruni*.

2.3.3.3. '*Candidatus* Phytoplasma prunorum': control i lluita

Com en tots els fitoplasmes i malalties sense cura, el control es basa en les intervencions sobre la tolerància/resistència i la sanitat del material vegetal, els vectors i les fonts d'inòcul. Inicialment cal un material vegetal de partida en un correcte estat sanitari, ja que en molts casos que solen ser especialment greus, les plantes ja venien infectades del viver. La tria del patró i la varietat adequades pot ser una bona eina pel control dels ESFY, però no es disposa encara de material vegetal tolerant amb aptituds òptimes per a totes les espècies. La sensibilitat de l'albercoquer i la prunera japonesa en desaconsella la plantació en zones on el patogen hi sigui endèmic. Pel que fa als patrons comercials més utilitzats, la majoria d'ells són tolerants, però multipliquen el fitoplasma i per tant poden infectar la varietat i fins i tot criar i infectar els vectors en els rebrots (Giunchedi *et al.*, 1982; Jarausch *et al.*, 1999; Jarausch *et al.*, 2000).

El control químic de *C. pruni* és poc eficaç, degut al seu cicle, el poc temps que roman a les plantacions i les baixes poblacions. Per una altra banda, és molt probable que els tractaments aplicats normalment a les plantacions, tinguin també una certa eficàcia, d'aquí la poca presència de *C. pruni* (Labonne i Lichou, 2004; Thebaud *et al.*, 2009).

Aquests tractaments no eviten la infecció dels conreus, ja que *C. pruni* pot transmetre el fitoplasma amb poques picades.

També es poden tractar químicament o eliminar els *Prunus* spp. salvatges on es reproduïx majoritàriament el vector, però la magnitud de la feina, i el perjudici per al medi natural serien massa grans (Labonne i Lichou, 2004; Jaurausch *et al.*, 2008). S'ha comprovat que individus concrets de *Prunus* spp. salvatges i infectats crieu grans poblacions de *C. pruni*. En aquests casos, l'eliminació puntual d'aquestes plantes salvatges o naturalitzades, si que pot ser una mesura efectiva. Aquests punts calents, poden trobar-se lluny de les plantacions, donada la mobilitat i capacitat per a cobrir llargues distàncies de *C. pruni*, i per tant, tampoc són fàcils de localitzar i tractar (Thebaud *et al.*, 2009). Actualment s'està treballant en la identificació de cairomones implicades en les conductes agregatives de *C. pruni*, que poden ser de gran utilitat per la implementació de captura massiva i millorar el control tant del vector com de la malaltia (Mayer *et al.*, 2010; Gross, 2011).

2.3.4. ‘*Candidatus Phytoplasma mali*’ (16SrX-A), l’agent causal de l’AP (“Apple proliferation” o Proliferació de la pomera)

2.3.4.1. Generalitats, hostes i simptomatologia

‘*Ca. P. mali*’ és l’agent causal de la proliferació de la pomera (AP) o “Apple proliferation”. És una malaltia que compromet seriosament aquest conreu a moltes parts d’Europa, ja que redueix totalment la collita i la qualitat, encara que moltes vegades no arribi a matar els arbres (Seemüller i Schneider, 2007). La primera referència que se’n té és a Itàlia a mitjans del segle passat (Rui *et al.*, 1950). Actualment està distribuït per tot Europa i recentment també ha estat identificat a la part asiàtica de Turquia (Canik i Ertunc, 2007; Mattedi *et al.*, 2008; Jarausch *et al.*, 2011). A Espanya, fins fa relativament poc, només s’havien trobat casos puntuals a la Cornisa cantàbrica i en viviers en material importat (Laviña *et al.*, 2011).



‘*Ca. P. mali*’ té com a hostes principals els *Malus* spp., encara que alguna vegada ha estat trobat en perera, avellaner, roser, arç blanc, *Crataegus monogyna* (Jacq, 1773), i prunera europea (Kaminska i Sliwa, 2004). La majoria de les varietats i portaempelts de *M. domestica* són susceptibles a ‘*Ca. P. mali*’.

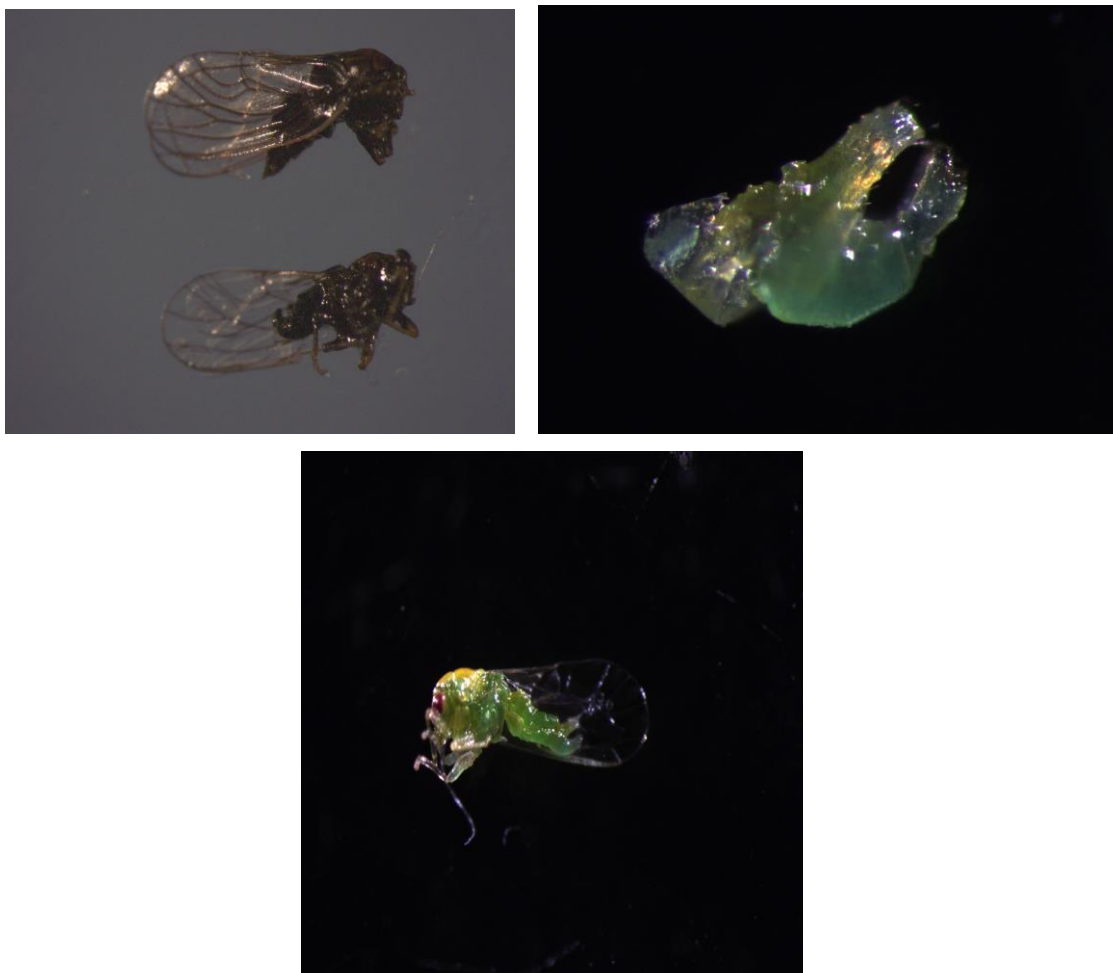
Figura 11. Proliferacions en pomera.

Després d’anys de cerca, s’ha trobat certa resistència en els portaempelts apomíctics provinents del creuament *M. seibodii* X *M. domestica*, però encara cal millorar-ne moltes característiques agronòmiques per a la seva implantació comercial (Seemüller *et al.*, 2008). Els símptomes de la proliferació de la pomera són: proliferació de brots laterals, escombres de bruixa, estípules allargades, brotacions anticipades, envermelliments a finals d’estiu, clorosi, fruits deformats sense color i amb poca concentració de sucres i pèrdua general de vigor i de collita (Lorenz *et al.*, 1995; Seemüller *et al.*, 2007).

2.3.4.2. *Cacopsylla picta* i *Cacopsylla melanoneura*, vectors de ‘*Candidatus Phytoplasma mali*’: cicles

‘*Ca. P. mali*’ és transmès mitjançant la multiplicació vegetativa de material infectat, empelts naturals entre arrels (Ciccotti *et al.*, 2007) i pels seus insectes vectors naturals. Aquets vectors són els psíl·lids *C. picta* (Frisinghelli *et al.*, 2000) i *C. melanoneura* (Tedeschi *et al.*, 2002). Ambdues espècies tenen una generació a l’any i passen l’hivern en forma d’adult en coníferes, presentant un cicle vital molt semblant al de *C. pruni*. A inicis de primavera els adults hivernants (remigrants) van a les plantacions de pomera per a copular i pondre-hi els ous. Les nimfes passen per cinc estadis en poc més d’un mes, esdevenint adults joves emigrants que es mouran cap a les coníferes a principis de juliol (Mayer *et al.*, 2009; Pizzinat *et al.*, 2011). L’hoste primari de *C. picta* són les

espècies del gènere *Malus*. *C. melanoneura* presenta un ventall menys restringit d'hostes primaris. El seu hoste primari principal és *C. monogyna*, però puntualment també es pot desenvolupar en *Malus* spp. i *Pyrus* spp., d'aquí la seva capacitat de transmissió de 'Ca. P. mali' (Tedeschi *et al.*, 2002; Mayer *et al.*, 2009). *C. picta* és el vector prevalent a gairebé tot Europa, havent estat capturat com a portador de 'Ca. P. mali' a Alemanya, França, Itàlia, Suïssa i Txèquia (Jarausch *et al.*, 2003; Mayer *et al.*, 2009; Baric *et al.*, 2010).



Figures 12, 13 i 14. D'esquerra a dreta i dalt a baix. *C. picta*: femella i mascle hivernals, genitèlia masculina i mascle estival

El paper com a vector de *C. melanoneura* és molt més restringit, ja que només se n'ha pogut demostrar la capacitat transmissora a la Vall d'Aosta, al Nord-oest d'Itàlia (Tedeschi i Alma, 2004; Mayer *et al.*, 2009). Probablement aquesta capacitat de transmissió de les poblacions de la Vall d'Aosta està relacionada amb l'existència de

raças o biotipus de l'insecte amb diferents preferències d'hoste. S'ha comprovat que constitueixen un grup genètic diferenciat, presentant més afinitat pels *Malus* spp. que d'altres poblacions europees de la seva espècie (Malagnini *et al.*, 2013).

La importància en una àrea concreta de *C. melanoneura* com a vector de 'Ca. P. mali' depèn principalment de l'afinitat dels insectes per les pomeres i pel grau d'infecció de les poblacions del seu principal hoste primari *C. monogyna*. El comportament migratori de les dues espècies de vectors, que arriben a desplaçar-se més de 50 km dos cops l'any, fa que la dispersió de la malaltia a noves plantacions sigui relativament fàcil i difícil de controlar (Mayer *et al.*, 2009; Barik *et al.*, 2010).

2.3.4.3. 'Candidatus Phytoplasma mali': control i lluita

Les estratègies de control de 'Ca. P. mali' no són massa diferents de les plantejades per a 'Ca. P. prunorum', ja que tots els seus vectors presenten una generació a l'any, es reproduïxen amb facilitat en hostes salvatges, i tenen una extraordinària mobilitat. Els cicles patològics de les dues malalties es diferencien bàsicament en el rang d'hostes i conreus afectats, ja que el gènere *Prunus* és més divers que el gènere *Malus*. Aquest fet, també es tradueix en un ventall més ampli de tolerància/sensibilitat, ja que les pomeres són majoritàriament susceptibles (Seemüller i Schneider, 2007). Com tots els fitoplasmes, també es transmet per multiplicació vegetativa, essent la sanitat del material vegetal de partida, un factor de base per al control de la malaltia. El fet que les pomeres formin empelts d'arrels de manera natural, encara fa més difícil el control un cop la plantació s'ha infectat (Ciccoti *et al.*, 2007).

Una mesura efectiva és evitar plantacions abandonades que poden servir de font d'inòcul i de cria del vector. Pel que fa als hostes salvatges, la seva arrancada generalitzada és inviable econòmicament i ambientalment, encara que en arbres propers a les plantacions, infectats i amb molta presència de vectors pot ser útil. Per a que els tractaments insecticides tinguin certa efectivitat, han de coincidir amb la arribada dels remigrants a finals de l'hivern i amb els emigrants de pas a les plantacions a finals de primavera. Cal tenir en compte que les dates dels pics poblacionals varien molt d'un any a un altre, i que per tant el seguiment de les poblacions és imprescindible per a

optimitzar els tractaments (Jarausch *et al.*, 2011; Tedeschi *et al.*, 2012). També cal tenir en compte que en floració continua l'arribada de remigrants i no es pot tractar. Amb tot això queda clar, que els insecticides poden ser una eina útil però no definitiva. Actualment, es troben en desenvolupament caïromones sintetitzades a partir de substàncies volàtils emeses per les pomeres infectades per atraure *C. picta* i perpetuar el cicle més eficientment (Gross, 2011).

2.3.5. ‘*Candidatus Phytoplasma pyri*’ (16SrX-C), agent causal del PD (“Pear decline” o Decaïment del perer) i el PYLR (Peach yellow leaf roll o Enrotllament cloròtic del presseguer)

2.3.5.1. Generalitats, hostes i simptomatologia

El decaïment del perer o “Pear decline”, és una malaltia que causa pèrdues econòmiques greus, tant per la mort directa dels arbres, com per la greu desvigorització i les pèrdues de collita. El primer cop que se'n té constància és al Canadà i a Itàlia als anys quaranta del segle XX, determinant Shalla *et al.* (1963) que tenien el mateix agent causal. L'enrotllament cloròtic del presseguer o PYLR va ser descrit per primera vegada a Califòrnia el 1951 per Nyland i Schlocker i ha causat epidèmies de certa importància durant els anys 70 i 80 del segle XX (Purcell *et al.* 1981). Fins els anys noranta es pensava que era produït pel mateix fitoplasma que el “Western X disease”, però amb la implementació de la PCR es va determinar que per a moltes d'aquestes epidèmies el seu agent causal era ‘*Ca. P. pyri*’ (Kison *et al.*, 1997). Més endavant es va demostrar que la infecció provenia de les plantacions de perer veïnes i que el seu vector era *C. pyricola* (Blomquist i Kirkpatrick, 2002).

‘*Ca. P. pyri*’ està àmpliament difós per tot Europa, essent la seva presència general a totes les zones productores de pera. També és present a l'Orient mitjà, l'Amèrica del Nord, Argentina, Austràlia i Taiwan, i a Espanya és molt present a la vall de l'Ebre (Avinent *et al.*, 1997; Garcia-Chapa *et al.*, 2005), on primerament va ser descrit per Rallo (1973). Recentment ‘*Ca. P. pyri*’ ha estat detectat al nostre país en presseguer

causant PYLR, essent la primera vegada fora d'Amèrica que se'n té constància (Sabaté *et al.*, 2014b). Els hosts naturals de 'Ca. *P. pyri*' són principalment *Pyrus communis* (Linnaeus, 1753) i altres espècies del gènere. També s'han observat casos generalitzats de decaïment en perers empeltats sobre *Cydonia oblonga* (Miller, 1768) (Garcia-Chapa *et al.*, 2003).



Figura 15. Perers afectats de “Pear decline”

La malaltia presenta dues pautes simptomatològiques: “Quick decline” o decaïment ràpid si el patró és oriental (*Pyrus ussuriensis*, *P. calleriana*, *P. serotina*, *P. pyrifolia*) o bé “Slow Decline” o decaïment lent si el patró és *P. communis* o *Cydonia sp.* (Davies *et al.*, 1992). En el decaïment ràpid la malaltia progressa fulminantment, i de sobte es pot observar com les fulles es marceixen i la planta mor. La causa d'aquesta mort ràpida és el xoc vascular que es produeix quan el patogen obtura els tubs cribosos. Aquesta infecció, unida a la discontinuïtat vascular del punt d'empelt que provoca la mala afinitat entre els dos materials vegetals, patrons orientals i *P. communis*, provoquen un efecte sinèrgic que provoca l'apoplexia (Schneider, 1977). El decaïment lent, es manifesta en una pèrdua de vigor gradual fins arribar a una paralització total de la brotació i la pèrdua completa de la collita. Les fulles van adquirint una coloració groguenca, i se'n va reduint la mida. També disminueix la quantitat, el calibre i el

contingut de sucre dels fruits (Schneider, 1977). Aquests símptomes solen anar acompanyats, ja des dels primers anys, d'enrogiments fora d'estació de les fulles, enrotllaments, taques necròtiques, i cap al final del cicle de la malaltia, defoliacions prematures (senescència avançada), que són el preludi de la mort de l'arbre. La severitat dels símptomes és molt variable, i pot fluctuar molt d'un any a un altre. La varietat també és un factor molt important en la severitat de la malaltia, ja que les varietats vigoroses la toleren millor que les varietats amb poc creixement com la llimonera, que se'n veu molt afectada. El decaïment lent és de difícil diagnòstic visual al camp, on es pot confondre amb facilitat amb d'altres malalties vasculars, excessos d'humitat, mals del coll, deficiències nutricionals, salinitat, estrès hídric, i en general qualsevol factor desvigoritzant (Garcia-Chapa *et al.*, 2003).



Figura 16. Presseguer amb símptomes de “Peach yellow leaf roll”.

Els símptomes de ‘*Ca. P. pyri*’ en presseguer són clorosi, enrogiments, enrotllament de les fulles, taques necròtiques foliars, manca de creixement, pèrdua de collita, mort de branques i finalment de tot l'arbre. Fins ara no s’han observat diferències significatives de sensibilitat varietal, afectant per igual al préssecs grocs, vermells, nectarines i paraguaians (Purcell *et al.* 1981).

2.3.5.2. *Cacopsylla pyri*, principal vector de 'Candidatus Phytoplasma pyri' a Europa: cicles

C. pyri és el psíl·lid del perer predominant i el principal vector de 'Ca. P. pyri' a Europa. Primerament es van demostrar les transmissions per *C. pyricola* i *C. pyrisuga* (Davies *et al.*, 1992) i més recentment per *C. pyri* (Carraro *et al.*, 1998b). *C. pyri* té 4 o 5 generacions l'any en funció de les temperatures, passa per 5 estadis nimfals, hiverna en forma d'adult, i pon els ous a finals d'hivern a l'escorça dels perers (Atger, 1982). Ocasionalment es pot trobar sobre altres vegetals, però el seu hoste obligat i l'únic on poden desenvolupar-se les nimfes és el gènere *Pyrus*. *C. pyri* és una de les plagues més importants del perer a Europa i està distribuït també pel Caucas i Àsia occidental. La seva importància com a plaga no ha deixat d'augmentar, degut principalment a la utilització massiva d'insecticides, que n'han desequilibrat el control natural i han afavorit l'aparició de resistències (Atger, 1982; Artigues *et al.*, 1995). El gran vigor de moltes plantacions per l'excés d'adobat també n'ha afavorit la proliferació, convertint-se així en un dels problemes sanitaris més importants d'aquest conreu (Jauset *et al.*, 2000). D'igual importància que els danys directes que provoca n'és la seva capacitat de transmissió de 'Ca. P. pyri'. El vector de PYLR als Estats Units és també *C. pyricola* en picar al presseguer com a hoste esporàdic (Blomquist i Kirkpatrick, 2002).

2.3.5.3. 'Candidatus Phytoplasma pyri': control i lluita

Com en el cas d'altres fitoplasmosi, el control del PD i el PYLR induïts per 'Ca. P. pyri', es basa en la tolerància/resistència i sanitat del material vegetal, el control dels vectors i les fonts d'inòcul. També és important la tria de patrons i varietats vigorosos, que tolerin millor la malaltia. Un cop la plantació està infectada, la majoria de mesures efectives van encaminades a potenciar el vigor de la plantació per a que els arbres es recuperin i continuïn produint mentre conviuen amb el patogen. El vigor es pot potenciar augmentant les dosi d'aigua i nutrients, esporgant més fort o fins i tot franquejant les varietats (Musetti *et al.*, 2004). Evidentment, el control del principal vector *C. pyri*, és molt important. No només per a evitar la infecció, sinó també per a evitar reinfeccions, que augmenten exponencialment la severitat de la malaltia. Per altra banda sempre és molt important el control d'aquest insecte en tota plantació de perers, ja que produeix danys directes i depreciació del fruit per la melassa que excreta (Atger,

1982). El control químic de *C. pyri* ha de ser respectuós amb els depredadors i realitzar-se en els moments adequats (Artigues *et al.*, 1995). També és important no aplicar un excés de nitrogen, i no abandonar el control un cop realitzada la collita, ja que precisament és a finals d'estiu i a la tardor quan més infectius son els vectors (Garcia-Chapa *et al.*, 2005). La principal font d'inòcul de '*Ca. P. pyri*' és el mateix conreu. Cal evitar les plantacions abandonades i arbres aïllats infectats, ja que fan de reservori tant de la malaltia com del vector. L'arrencada dels arbres malalts també pot tenir un cert efecte en la reducció de l'inòcul disponible, però cal tenir en compte que la progressió de la malaltia és lenta, i que els arbres sense símptomes també poden estar infectats. Per tant, en plantacions amb incidències elevades, es recomanable l'arrencada total, que pot allunyar el problema durant anys, especialment si no hi ha altres plantacions de perer infectats al voltant (Davies *et al.*, 1992).

2.4. '*Candidatus Phytoplasma vitis*' (16SrV-D) i '*Candidatus Phytoplasma solani*' (16SrXII-A), agents causals de la Flavescència daurada i del "Bois Noir" o Fusta negra de la vinya respectivament

2.4.1. '*Candidatus Phytoplasma vitis*': generalitats, hostes, simptomatologia i transmissió

'*Ca. P. vitis*' és el fitoplasma més agressiu que afecta a la vinya a Europa. '*Ca. P. vitis*' o 16SrV-D pertany al grup V dels fitoplasmes o "Elm Yellows group" (grup EY), juntament amb '*Ca. P. ulmi*' o 16SrV-A (Elm yellows), '*Ca. P. ziziphi*' o 16SrV-B, 16SrV-D o soca oriental de la Flavescència daurada i '*Ca. P. rubi*' o "Rubus stunt", 16SrV-E. Dins el subgrup 16SrV-C de la Flavescència daurada, també s'hi inclou la malaltia de "Alder yellows" o Esgroqueïments del vern, ja que tenen identitats genètiques extremadament semblants (Angelini *et al.*, 2001). Molt probablement '*Ca. P. vitis*' provingui de l'adaptació dels "Alder yellows" a la vinya i la formació d'un cicle patològic tancat en aquest nou hoste. S'ha comprovat que la malaltia de la vinya anomenada "Palatinate grapevine yellows", té el mateix agent causal que els Esgroqueïments del vern, i que és transmesa pel mateix vector, *Oncopsis alni* (Shrank,

1801) (*Hemiptera, Cicadellidae*), en picar accidentalment a les vinyes (Angelini *et al.*, 2001). La Flavescència daurada de la vinya és una de les malalties més greus que amenacen aquest conreu, ja que provoca la mort dels ceps en pocs mesos i té una disseminació ràpida. El seu agent causal, ‘*Ca. P. vitis*’, està circumscrit a Europa, on es troba distribuït a gairebé tots els països. Ha provocat greus epidèmies a Itàlia i a França, arribant a destruir completament àmplies superfícies (Boudon-Padieu i Maixner, 1998).



Figures 17 i 18. Vinyes afectades de Flavescència daurada i *Scaphoideus titanus*.

A la Península Ibèrica és present ara mateix només a Portugal, on es va detectar recentment, per bé que durant els últims vint anys s’han detectat focus aïllats a l’Empordà que han estat eradicats amb èxit (Batlle *et al.*, 1997; Rahola *et al.*, 1997; Sousa *et al.*, 2010).

El principal hoste de ‘*Ca. P. vitis*’ és la vinya (*Vitis vinifera* (Linnaeus, 1753)) i altres vitàcies americanes usades com a patró com *V. riparia*. Els símptomes són semblants als provocats per altres fitoplasmes a la vinya, essent la principal diferència la rapidesa en la propagació i el col·lapse dels ceps. Normalment provoca clorosi o vermellors, depenent de si és una varietat blanca o negra, enrotllament de les fulles, manca de lignificació, avortament de fruits, pèrdua de vigor i col·lapse general (Caudwell, 1961; Angelini *et al.*, 2001). Segons les hipòtesis més plausibles, la Flavescència daurada va augmentar la seva incidència quan un vector eficient en la transmissió entre vinyes, *Scaphoideus titanus* (Ball, 1932) (*Hemiptera, Cicadellidae*) va arribar a Europa. Fins llavors, la vinya havia estat un hoste cul de sac per a aquest fitoplasma, provocant tan sols una malaltia anecdòtica com el “Palatinate grapevine yellows”. Aquesta transmissió entre vinyes independent dels verns i de *O. alni* és el que ha propiciat l’allunyament

genètic entre els dos fitoplasmes (Arnaud *et al.*, 2007). També s'ha demostrat que *Dyctiophara europaea* (Linnaeus, 1767), malgrat tenir unes baixes taxa d'infecció i capacitat de transmissió, és capaç de transmetre 'Ca. P. vitis' adquirit sobre *Clematis vitalba* (Linnaeus, 1753) a *V. vinifera* (Filippin *et al.*, 2009).

S. titanus és un insecte originari de l'Amèrica del Nord, trobant-se a Europa per primera vegada als anys cinquanta del segle XX. Aquest vector es olífa de la vinya i espècies afins, té una generació a l'any i passa l'hivern en forma d'ou als sarments. *S. titanus* té cinc estadis ninfals en els quals ja pot ser infectiu, però la poca mobilitat de les nimfes fa que la seva importància en la disseminació sigui petita (Chuche i Thiéry, 2014). Cal remarcar però, que és en estat ninfal, quan l'adquisició del fitoplasma és més efectiva, ja que quan es converteixin en adults hauran cobert plenament la latència i tindran un període infectiu amb capacitat de disseminació màxim. El fet que *S. titanus* s'alimenti exclusivament de vinya fa que la disseminació de la malaltia sigui ràpida, però per una altra banda, permet que els tractaments insecticides siguin relativament efectius en el control del vector (Chuche i Thiéry, 2014).

La lluita contra la Flavescència daurada se centra en dos aspectes, el control del vector i l'eliminació de les fonts d'inòcul. La principal font d'inòcul són les mateixes vinyes infectades, per tant l'eliminació dels ceps malalts i els del seu voltant és una acció necessària. També és important el control i arrencada de les vinyes abandonades i naturalitzades, on el vector pot proliferar i el fitoplasma pot mantenir-se durant anys (Caudwell *et al.*, 1987). Els hostes salvatges com *Clematis* spp. també poden actuar com a reservori del fitoplasma, però al no ser bons hostes del principal vector *S. titanus*, la seva importància està restringida al manteniment de l'inòcul de 'Ca. P. vitis' a llarg termini. En estudis fets als Balcans i a Itàlia, s'ha comprovat que el 36% de mostres de *C. vitalba* eren positives a 'Ca. P. vitis'. Els tractaments insecticides sobre *S. titanus*, s'han mostrat efectius per al control de la malaltia, ja que el vector viu principalment sobre les vinyes conreades. Es recomanen dos tractaments amb piretrines, un al juny contra nimfes i un altre al juliol contra adults. També es recomana fer monitoreig d'adults amb trampes grogues per a fer tractaments en funció de les captures (Chuche i Thiéry, 2014).

2.4.2. ‘*Candidatus Phytoplasma solani*’, agent causal de la fusta negra o “Bois noir” de la vinya

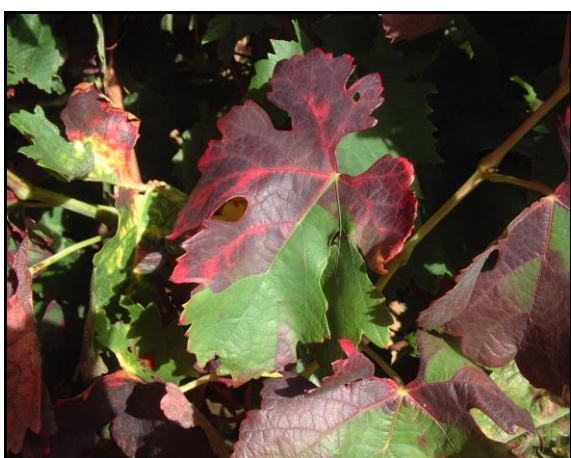
2.4.2.1 Generalitats, hostes i simptomatologia

‘*Ca. P. solani*’ o 16SrXII-A pertany al grup STOL o grup ribosòmic XII dels fitoplasmes, juntament amb ‘*Ca. P. australiense*’(16SrXII-B), agent causal dels “Australian Grapevine Yellows”, Strawberry lethal yellows (16SrXII-C), ‘*Ca. P. japonicum*’ (16SrXII-D) i ‘*Ca. P. fragariae*’ (16SrXII-E) (Wei *et al.*, 2007)(Annex 4).

‘*Ca. P. solani*’ és l’agent causal d’un conjunt de malalties conegudes majoritàriament com a “Stolbur” (esterilitat de flors en rus) i que en vinya s’anomena “Bois Noir” o Fusta negra. Aquest fitoplasma té un ampli ventall d’hostes en moltes famílies vegetals, incloent plantes anuals, perennes i llenyoses. És un fitoplasma comú en solanàcies, on provoca grans pèrdues, essent en aquesta família on la malaltia que causa es va anomenar inicialment “Stolbur”. També és un fitoplasma comú en conreus hortícoles d’altres famílies com api, pastanaga i julivert (Batlle *et al.*, 2008; Carraro *et al.*, 2008; Quaglino, *et al.*, 2013); ha estat identificat causant alteracions en conreus llenyosos com alvocat, pomer, perer, ametller i vinya, essent en vinya un problema econòmic important a pràcticament tot Europa (Caudwell, 1961; Laviña *et al.*, 1995, Maixner *et al.*, 1995; Sabaté *et al.*, 2014a). També s’ha detectat en multitud de plantes hoste silvestres de diferents famílies de gran importància en el cicle patològic, com ara *Convolvulus arvensis* (Linnaeus, 1753), *Urtica dioica* (Linnaeus, 1753), *Lavandula* spp. i *Calystegia sepium* (Linnaeus, 1753) (Langer i Maixner, 2004).

‘*Ca. P. solani*’ està present a tot el món en especial en conreus de solanàcies, però és a Europa i la conca mediterrània on la seva presència és més important. ‘*Ca. P. solani*’ presenta una variabilitat genètica molt gran en consonància amb l’ampli rang d’hostes i cicles patològics que presenta. S’han identificat un gran nombre de soques associades a hostes, cicles i virulències diferenciades (Murolo *et al.*, 2010; Quaglino *et al.*, 2013).

La incidència de la fusta negra pot arribar a ser superior al 80% allà on hi ha importants poblacions d'hostes del fitoplasma i del vector, i revertir en importants pèrdues econòmiques. Els països més afectats són França, Alemanya, països Balcànics i el Nord d'Itàlia, per bé que en zones més càlides també hi ha causat epidèmies importants (Sforza *et al.*, 1998; Cimerman *et al.*, 2009). Els seus principals símptomes en vinya són la manca de vigor i agostament, avortament de fruits, nervis cloròtics en varietats blanques i enrogiments en varietats negres, arrugament de les fulles, mala floració i quallat, pèrdues de collita i mort de peus (Maixner *et al.*, 1995).



Figures 19, 20 i 21. Síntomes de fusta negra en les varietats chardonnay i garnatxa.

2.4.2.2. *Hyalesthes obsoletus*, vector de ‘*Candidatus Phytoplasma solani*’: cicles

‘*Ca. P. solani*’ presenta un gran rang d’hostes vegetals i en conseqüència pot ésser transmès també per diferents espècies de cíxids i cicadèl·lids. El seu principal vector a Europa és el cíxid polífrag *Hyalesthes obsoletus* (Signoret, 1865) (*Hemiptera, Cixidae*), seguit d’altres cíxids menys abundants com ara *Reptalus panzeri* (Löw, 1883) (*Hemiptera, Cixidae*) (Maixner *et al.* 1994, Palermo *et al.*, 2004). Diverses espècies de cicadèl·lids com ara *Macrostelus laevis* (Ribaut, 1927) (*Hemiptera, Cicadellidae*), *Macrostelus quadripunctulatus* (Kirschbaum, 1868) (*Hemiptera, Cicadellidae*), *Euscelidius variegatus* (Kirschbaum, 1858) (*Hemiptera, Cicadellidae*), i *Agallia laevis* (Ribaut, 1935) (*Hemiptera, Cicadellidae*), han estat identificades com a vectores en condicions experimentals (Batlle *et al.*, 2008, Riedle-Bauer *et al.*, 2008). Altres espècies de cicadèl·lids han estat identificades com a portadores del “Stolbur” en condicions de camp, suggerint, juntament amb la existència de grans infeccions sense captura de cíxids, que el rang d’espècies vectores d’aquest fitoplasma podria ser més ampli (Batlle *et al.*, 2000; Weintraub i Beanland, 2006). *H. obsoletus* està distribuït per gairebé tot Europa i la Conca Mediterrània, té una generació a l’any i passa l’hivern alimentant-se de les arrels dels seus hostes durant cinc estadis ninfals. Els adults de *H. obsoletus* emergeixen de maig a juliol, depenent de les temperatures de la primavera i de l’hoste, i és llavors quan es dispersen, s’acoblen i ponen els ous que eclosionaran l’hivern següent.

H. obsoletus és un insecte polífrag, especialment com a adult, quan pot picar i transmetre stolbur a un gran ventall de espècies, entre elles la vinya. En estat ninfal els seus hostes són més restringits, essent els principals *Urtica dioica* i *Convolvulus arvensis*, encara que també s’ha descrit desenvolupant-se en *Lavandula angustifolia*, *Lepidium draba* i *Calystegia sepium* (Sforza *et al.*, 1998; Bressan *et al.*, 2007; Lessio *et al.*, 2007; Maixner *et al.*, 2009) **Figura 22.** *Hyalesthes obsoletus*



H. obsoletus adquireix el patogen durant la seva llarga alimentació hivernal en forma de nimfa a les arrels, cobrint sobradament el període de latència. Quan emergeixen els adults, ja plenament infectius, es dispersen buscant nous hostes on acoblar-se i pondre els ous, i és en aquest moment quan transmeten el fitoplasma a les vinyes. Aquest conreu s'infecta accidentalment quan el vector s'hi alimenta puntualment, ja que no n'és un hoste preferit. Per aquest motiu es considera que la vinya és un hoste cul de sac de 'Ca. P. solani', ja que el fitoplasma no es transmet entre vinyes i aquest conreu no compleix cap paper en el cicle.

'Ca. P. solani' presenta diferents cicles patològics en funció dels hostes, normalment poc connectats. Els casos més estudiats són *U. dioica* i *C. arvensis* (Maixner *et al.*, 2009). En aquestes plantes es poden distingir dues soques principals ben diferenciades epidemiològica i molecularment associades a cada una d'elles: *Tuf-a* en *U. dioica* i *Tuf-b* en *C. arvensis*, essent la soca *Tuf-a* més virulenta (Langer i Maixner, 2004). Aquesta diferenciació també es reflecteix en el vector *H. obsoletus* on les poblacions sobre *C. arvensis* i *U. dioica* presenten patrons genètics diferents. Mitjançant la el gen *Vmp1* s'ha comprovat la variabilitat d'aquest fitoplasma, ja que s'han pogut trobar més de 15 aïllats diferents, encara que no tenen una atribució epidemiològica tan clara com les races del gen *Tuf* (Cimerman *et al.*, 2009 ; Pacifico *et al.*, 2009).

2.4.2.3. 'Candidatus Phytoplasma solani': control i lluita

La plantació de material vegetal sa i tolerant a la malaltia és imprescindible per a evitar grans danys i pèrdues. Varietats de vinya molt sensibles com Chardonnay s'han d'evitar en zones on hi hagi inòcul (Weintraub i Jones, 2010). La lluita contra el seu vector amb mitjans químics no és massa efectiva, ja que al viure preferentment fora de les vinyes els tractaments sobre el conreu no l'afecten. Fins i tot quan el tractament és realment efectiu l'insecte té temps d'infectar moltes vinyes abans de morir. Si que són relativament efectius els tractaments sobre les plantes hoste de l'insecte, però han de ser insecticides fortament sistèmics per a que arribin fins a les arrels on viuen les nimfes. El principal inconvenient d'aquests tractaments sobre males herbes és que no es poden aplicar al medi natural, on prolifera l'insecte (Maixner *et al.*, 2009).

Pel que fa a les mesures de control sobre les fonts d'inòcul, és important tenir en compte, que la vinya és un hoste cul de sac que no propaga la malaltia. El vector no adquireix la malaltia en la vinya, i per tant l'arrencada dels ceps malalts no té cap efecte en el control de l'expansió. El control de les plantes hoste principals dels cicles patològics, si que és efectiu per a disminuir la incidència, la gravetat i l'expansió de la malaltia (Maixner, 2011). Per al cas del "Bois noir", les principals fonts d'inòcul són *U. dioica* i *C. arvensis*, males herbes perennes que poden trobar-se fins i tot dins de les parcel·les. El control efectiu d'aquestes espècies és complicat, però si és exitós, té un doble efecte, ja que a més d'eliminar l'inòcul també redueix les poblacions del vector (Maixner *et al.*, 2009). La millor manera de controlar aquestes plantes és combinar tractaments herbicides, talls d'herba, llaurats i fins i tot arrencades manuals, en funció de la fenologia i la situació de les herbes a la parcel·la. Cal tenir en compte que els fitoplasmes no es transmeten per llavor, i que per tant les males herbes d'un any, procedents de llavor no són un perill immediat (Mori *et al.*, 2007). Si que constitueixen importants fonts d'inòcul els grans massissos d'ortigues i catifes de corretjoles perennes, que tenen una gran capacitat de cria de vectors i que per la seva longevitat tenen moltes probabilitats d'estar infectades. Actualment, s'estan posant a punt sons disruptors de l'aparellament de *H. obsoletus* com a tècnica de control, i també estratègies de "push and pull", és a dir, foragitar l'insecte de les vinyes i atreure'l cap a plantes allunyades del conreu (Mazzoni *et al.*, 2010; Murolo *et al.*, 2010; Maixner, 2011).

III OBJECTIUS

L'objectiu general d'aquesta Tesi Doctoral és contribuir al coneixement sobre l'epidemiologia de les fitoplasmosi dels fruiters i de la vinya a la Península Ibèrica. S'avaluaran àrees d'importància en la producció frutera i vitivinícola de vuit comunitats autònomes de l'Estat espanyol, tot abordant diferents aspectes epidemiològics de les principals malalties associades als fitoplasmes presents.

Referents a la epidemiologia dels Esgroqueïments dels fruiters de pinyol (ESFY) a Aragó, Catalunya, Extremadura i la Comunitat Valenciana.

1. Determinar la distribució geogràfica i la incidència de '*Candidatus Phytoplasma prunorum*', agent causal dels Esgroqueïments als fruiters de pinyol (ESFY) a les zones indicades.
2. Llistar les espècies i varietats de fruiters de pinyol més afectades per '*Ca. P. prunorum*' en les condicions de cultiu de cada una de les comunitats esmentades.
3. Confirmar la presència de *Cacopsylla pruni*, principal vector de '*Ca. P. prunorum*', en parcel·les de les mateixes zones afectades per ESFY, aprofundint en el coneixement de la seva epidemiologia: hostes i cicles del patogen i el vector.
4. Establir els riscos de dispersió de '*Ca. P. prunorum*' i *C. pruni* per a les diferents zones i espècies de fruiters de pinyol, proposant mesures de control i estratègies per a reduir-ne el seu impacte i incidència.

Referents a l'epidemiologia de la proliferació de la pomera (AP) a Astúries, Catalunya, País Basc i Navarra.

5. Determinar la distribució geogràfica i la incidència de '*Candidatus Phytoplasma mali*', així com les varietats de pomera i les condicions de cultiu amb més afectació de proliferació de la pomera (AP) a les diferents zones.
6. Determinar la presència dels vectors *Cacopsylla picta* i *Cacopsylla melanoneura*, les seves dinàmiques poblacionals i taxes d'infecció per '*Ca. P. mali*', tot proposant les mesures de control i les estratègies per a minimitzar les pèrdues degudes a aquesta malaltia.
7. Avaluar el risc de dispersió de *C. picta* i *C. melanoneura* en plantacions de pomera en zones productores on fins ara no es té constància de la malaltia.

Referent a una nova fitoplasmosi del presseguer a Espanya.

8. Identificar i caracteritzar genèticament una nova síndrome de simptomatologia possiblement fitoplasmàtica en presseguers de Lleida (Catalunya), avaluant el possible cicle patològic i els riscos futurs d'epidèmia.
9. Proposar mesures per a evitar l'expansió de la malaltia a noves zones i minimitzar els danys.

Referents a la Fusta negra de la vinya o “Bois Noir” a cinc comunitats de la vall de l’Ebre (Aragó, Catalunya, La Rioja, País Basc i Navarra).

- 10.** Determinar la distribució geogràfica i la incidència de ‘*Candidatus Phytoplasma solani*’, així com les varietats de vinya més afectades per aquest patogen a la Vall de l’Ebre.
- 11.** Determinar la presència i distribució geogràfica del seu principal vector, *Hyaesthes obsoletus*, en parcel·les de vinya amb símptomes de Fusta negra, tot definint les seves dinàmiques poblacionals, cicles, hostes, taxes d’infecció i soques del patogen.
- 12.** Definir el riscs epidèmics de ‘*Ca. P. solani*’ a les diferents zones de producció vitícola i per a les varietats de vinya més plantades a la Vall de l’Ebre, tot proposant mesures i estratègies per al seu control.

Capítol 1. Epidemiologia de 'Candidatus Phytoplasma prunorum'

Títol: Incidència i distribució de 'Candidatus Phytoplasma prunorum' i del seu vector *Cacopsylla pruni*, a España: una aproximació a l'epidemiologia i el rol dels *Prunus* salvatges

Article resumit

'Candidatus Phytoplasma prunorum' és l'agent causal de la malaltia dels "European stone fruit yellows" o Esgrogueïments europeus dels fruiters de pinyol. Aquest fitoplasma afecta moltes espècies de *Prunus* salvatges o cultivats en diferents graus, d'acord amb la seva sensibilitat. 'Ca. P. prunorum' ha estat identificat a les quatre comunitats estudiades: Aragó, Catalunya, Extremadura i València, per bé que amb incidències molt diferents. Els resultats han mostrat que aquest fitoplasma ha estat detectat a totes les espècies cultivades estudiades, excepte a *P. avium* i *P. dulcis*. També s'ha confirmat que està present a les quatre comunitats. L'espècie més afectada és la prunera japonesa (*P. salicina*) amb símptomes greus com ara avançament vegetatiu, descompassament de la floració, enrotllament de fulles, clorosi i col·lapse, que provoquen una gran davallada de la producció i l'arrencada de les parcel·les afectades. En algunes parcel·les del Baix Llobregat la incidència de 'Ca. P. prunorum' en *P. salicina* està pel damunt del 80%. L'insecte vector, *C. pruni*, també està present a les quatre comunitats, presentant les captures més altes al Baix Llobregat en bardisses de *P. mahaleb* i a Extremadura en parcel·les de presseguer. Al Baix Llobregat, *C. pruni* és present amb poblacions i taxes d'infecció remarcables sobre *P. mahaleb* també infectats. *P. mahaleb* esdevé així un hoste clau en el cicle patogènic local que ha causat una gran epidèmia sobre els conreus de *P. salicina* veïns. 'Ca. P. prunorum' està disseminat per tota la comarca del Baix Llobregat en la majoria d'espècies de fruiters de pinyol. La incidència és menor a la Ribera d'Ebre, però no és menyspreable, ja que arriba fins a un 30% en prunera japonesa, en parcel·les on també s'ha capturat el vector *C. pruni*. A la part central de la vall de l'Ebre (Aragó i la plana de Lleida) la incidència és molt baixa, per sota del 5% a les poques parcel·les afectades, i el vector hi és extremadament escàs. A València, la incidència també és molt baixa, fins i tot en

espècies molt susceptibles com ara l'albercoquer i la prunera japonesa, capturant-se molt pocs individus del vector. Pel que fa a Extremadura, la incidència a la zona de las Vegas Altas arribava pràcticament al 30% en presseguer, espècie que normalment no presenta incidències tan elevades, ja que malgrat ser sensible no és un dels hostes preferits per *C. pruni*. En aquestes parcel·les les captures de *C. pruni* també van ser elevades, portant a pensar que les poblacions d'aquesta zona poden constituir un biotipus diferent amb més afinitat per *P. persica*, podent presentar un cicle patològic diferent. Pel que fa a la taxa d'infecció per 'Ca. P. prunorum' dels individus de *C. pruni*, s'ha observat que és superior al 30% en alguns casos, i que a les zones més afectades per la malaltia, o sobre hostes especialment infectats, és superior. També s'ha corroborat que els individus hivernants (remigrants) tenen una taxa d'infecció superior als adults de primavera (emigrants), amb un 30% i un 10%, respectivament. Aquestes taxes d'infecció indiquen que el moment amb més perill d'infecció és amb l'arribada a les plantacions dels individus hivernants. En base als resultats obtinguts, s'han establert recomanacions com l'eliminació d'alguns arbres que actuen de reservori del fitoplasma i hàbitat dels vectors. També es recomana en zones endèmiques per a la malaltia, no plantar espècies/varietats sensibles. Les dades obtingudes també han permès avaluar el risc d'altres incidències i de dispersió per a les diferents zones i conreus.

Incidence and distribution of 'Candidatus Phytoplasma prunorum' and its vector *Cacopsylla pruni* in Spain: an approach to the epidemiology of the disease and the role of wild *Prunus*

J. Sabaté, A. Laviña and A. Batlle

IRTA, Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries, Ctra Cabrils km 2, 08348 Cabrils, Barcelona, Spain

Plant Pathology 2015. doi/10.1111/ppa.12464

Abstract

'Candidatus Phytoplasma prunorum' is the causal agent of the European stone fruit yellows (ESFY) disease. This phytoplasma affects wild and cultivated species of *Prunus* to different degrees, depending on their susceptibility. 'Ca. P. prunorum' is present in the four regions of Spain surveyed in this study (Aragon, Catalonia, Extremadura and Valencia) with a variable incidence. Results showed that 'Ca. P. prunorum' was detected in all of the cultivated *Prunus* species studied, except *P. avium* and *P. dulcis*, and was widespread in Spain. The most affected species was *P. salicina*, with symptoms including early bud break and blooming, leaf curling and yellowing, collapse, and a major decrease in production. In some plots in the Baix Llobregat area of Barcelona province (Catalonia), the incidence of ESFY on *P. salicina* was as high as 80%. The insect vector was present in all four of the regions studied, with the highest captures in yellow sticky traps in Catalonia on *P. mahaleb* and in Extremadura in peach orchards. In Baix Llobregat, large populations of *C. pruni* were present on infected *P. mahaleb* bushes, and with high infection rates, being a key factor in the local pathogenic cycle that caused a major ESFY outbreak in the nearby *P. salicina* orchards. In the Ebro valley (Lleida and Aragon) and Valencia, the surveys showed very low incidences of the disease and low *C. pruni* populations.

Introduction

'*Candidatus Phytoplasma prunorum*' is the causal agent of several diseases of stone fruit trees such as apricot chlorotic leaf roll, plum leptonecrosis and peach yellows. These are collectively referred to as European stone fruit yellows (ESFY) disease, a major problem affecting stone fruit trees in Europe (Lorenz *et al.*, 1994). 'Ca. P. prunorum' belongs to the apple proliferation (16Sr-X ribosomal) group, and is closely related to 'Ca. P. mali' and 'Ca. P. pyri', causing apple proliferation (AP) and pear decline (PD), respectively (Seemüller & Schneider, 2004; Danet *et al.*, 2011). ESFY is a quarantine disease that is widespread in Europe and the Mediterranean basin and is a limiting factor for apricot and Japanese plum tree cultivation in several major growing areas (Marcone *et al.*, 2010; Cieslinska, 2011; Steffek *et al.*, 2012).

ESFY symptoms and their intensity vary considerably depending on different factors: *Prunus* species, variety and rootstock; age; agro-ecological conditioning; phytoplasma concentration; insect vector infection pressure, and strain virulence. The symptoms are generally characterized by physiological disorders such as short internodes, off-season growth, premature bud break, leaf rolling, chlorosis, reddening, slow or sudden decline and a loss of vigor and production (Kison & Seemüller, 2001; Marcone *et al.*, 2010). The expression and intensity of the symptoms range from more susceptible species, such as *Prunus salicina* and *P. armeniaca*, to the most tolerant ones, such as *P. cerasifera* and *P. spinosa*, which may be infected but symptomless (Giunchedi *et al.*, 1982; Jarausch *et al.*, 2000; Carraro *et al.*, 2002; Yvonne *et al.*, 2004). 'Ca. P. prunorum' is transmitted by vegetative multiplication and by its insect vector *Cacopsylla pruni* (Scopoli, 1763; Carraro *et al.*, 1998). *C. pruni* is oligophagous on *Prunus* species, univoltine and overwinters as an adult in refuge plants, mainly conifers far from the orchards (Thebaud *et al.*, 2009). In late winter, depending on the climate conditions, the overwintering adults (remigrants) lay next generation eggs on *Prunus* species, where nymphs develop. In June, young adults (emigrants) move to refuge trees to overwinter. *C. pruni* acquires the phytoplasma within 2–4 days and is infective for the rest of its life, after a latency period of approximately 3 weeks (Carraro *et al.*, 2004; Labonne & Lichou, 2004; Thebaud *et al.*, 2009).

ESFY was first reported in Spain, by Sala (1935), on Japanese plum in the Baix Llobregat area (Barcelona, Catalonia), where it appeared as a syndrome similar to those

observed before in southern France and Italy (Marcone *et al.*, 2010). More recently, vegetative disorders have been observed in Japanese plum and apricot growing in Valencia, Murcia and Catalonia regions (Llácer *et al.*, 1986; Torres *et al.*, 2004). *C. pruni* carrying 'Ca. P. prunorum' was first reported in Spain in 2003 (Laviña *et al.*, 2004). Given the importance of stone fruit cultivation in Spain, the destructive potential of ESFY and its geographical dispersion, there is a serious threat for Spanish stone fruit production. The aim of this study was to obtain data on the incidence, hosts, life cycles and geographical distribution of 'Ca. P. prunorum' and *C. pruni* in Spain. These data will be helpful to evaluate the losses and the risk of spread for different species and regions to establish control measures and prevent the expansion of ESFY.

Materials and methods

Incidence of 'Ca. P. prunorum' on different *Prunus* species, orchards and regions

The incidence of 'Ca. P. prunorum' was studied in 2005, in four regions in Spain, Aragón, Catalonia, Extremadura and Valencia, in seven stone fruit production areas with different characteristics. A total of 47 plots of seven cultivated *Prunus* species were studied. Plots were chosen with the advice and collaboration of the regional phytopathological services, which identified orchards that were representative of each area and species. The incidence of 'Ca. P. prunorum' was evaluated in orchards of *P. avium*, *P. salicina*, *P. cerasifera*, *P. armeniaca*, *P. persica*, *P. domestica* and *P. dulcis*. The objective was to cover a wide range of hosts and agro-ecological conditions, including tolerant species and areas with few reported cases of ESFY. The incidence of 'Ca. P. prunorum' was surveyed in the Baix Llobregat, Ribera d'Ebre and Lleida areas of Catalonia, in the Vegas Altas and Vegas Bajas areas of Extremadura, and in Aragón and Valencia. The incidence of ESFY was initially assessed by visual inspection of 200 trees per orchard in a large central block and subsequently confirmed by PCR. To standardize variations in the expression of ESFY symptoms in different conditions, species and varieties, visual inspections were carried out in March and September. The whole symptom range was covered: phenological mismatch in March, and yellowing, curling and reddening in September.

The assessment was particularly concentrated in the Baix Llobregat area (Barcelona, Catalonia), in 22 plots. The coincidence in a small area of historic reports, a

high incidence, several wild and cultivated *Prunus* spp. and a stable population of *C. pruni*, makes this area an interesting case to study. This area includes the lower valley of the Llobregat River and the coastal mountains, both with a Mediterranean climate. The valley is characterized by flat gravity-irrigated intensive orchards, devoted to cultivating vegetables and stone fruit trees. In the mountains there are small, non-irrigated orchards of *P. avium* grafted on *P. mahaleb*. Two other areas in Catalonia were studied. One in Ribera d'Ebre, in Tarragona province in the lower valley of the Ebro River, also has a Mediterranean climate and has intensive drip-irrigated orchards of *P. persica*, *P. salicina* and *P. armeniaca*. The other, Lleida, is in the plains of the central Ebro valley with a dry continental Mediterranean climate. This area is mainly dedicated to peach, apple and pear production in large, intensive drip-irrigated orchards.

The Aragon region fruit production area, as Lleida, is in the central Ebro valley, and both have the same agro-ecological conditions. The Valencia area is characterized by small, flat drip-irrigated orchards of *P. salicina* and *P. armeniaca*, with a Mediterranean climate. In Extremadura, the fruit production areas are characterized by a southern Mediterranean climate and large new, drip-irrigated, orchards of *P. salicina* and *P. persica*. In each plot, the shoot samples for phytoplasma detection were taken, in September, randomly, from 10 individual trees showing symptoms of ESFY. To ensure detection, samples were taken from four branches per tree. In orchards where fewer than 10 trees had clear symptoms, samples were collected from those with symptoms, and randomly from symptomless trees to give 10 samples per plot. In plots with no symptoms, all samples were taken randomly from any tree. Samples were stored in plastic bags at 4 C prior to DNA extraction.

***C. pruni* captures in *Prunus* species orchards**

C. pruni populations on different cultivated *Prunus* species were surveyed using yellow sticky traps in the four regions. The surveys were begun in the Baix Llobregat area with eight traps per plot in 2003 and 2004, four in the center and four in the corner trees of the orchards. In following years, due to the results obtained, only the four traps in the corners were used. In 2005 and 2006, the surveys were extended to the other areas and regions. In Catalonia, affected *P. salicina* orchards were also monitored by beating. Different branches on trees were beaten 10 times and psyllids were collected and

aspired from a tray. The 20X20 cm (800 cm²) yellow sticky traps (Projar), placed at a height of 1.75 m, were replaced once every 15 days, from January to July. *C. pruni* individuals were then removed, identified following (Hodkinson & White, 1979) and stored at -20C prior to analysis. The insects were analysed individually.

Evaluation of wild hosts for 'Ca. *P. prunorum*' and *C. pruni* in Catalonia

The communities of potential wild hosts for 'Ca. *P. prunorum*' and *C. pruni* in the three stone fruit production areas of Catalonia were surveyed in 2009 and 2010. Five communities of *P. mahaleb*, four of *P. spinosa*, two of *P. cerasifera* and one of naturalized *P. domestica* were studied in the coastal mountains of the Baix Llobregat. In these mountains, wild *P. mahaleb* is relatively abundant above 100 m a.s.l., most of them naturalized rootstocks from old deserted *P. avium* orchards. There are also small communities of wild *P. spinosa* above 400 m a.s.l. The Ribera d'Ebre area (Tarragona) is surrounded by the broken 1000 m-high precoastal mountains, where a *P. mahaleb* community was studied. In the Lleida area, two plots of *P. spinosa* and three plots of naturalized *P. dulcis* near the orchards were studied. These *P. spinosa* trees are present above 500 m a.s.l. in the Pyrenean foothills, but the nearest stone fruit orchards are 30 km away. The samples of wild or naturalized, symptomless *Prunus* spp. were taken as described for the symptomless orchards. The number of samples varied with the size of the community, with a maximum of 10 individuals per plot. *C. pruni* was captured on wild hosts by yellow sticky traps and beating the trees as described for orchards.

Phytoplasma detection in plants and insects

The samples of *Prunus* plants and *C. pruni* individuals were analysed by PCR to detect phytoplasmas. Total DNA from plants was obtained by mixing 1 g of fresh leaf midribs and phloem tissue from stems together, using the phytoplasma-enrichment procedure of Ahrens & Seemüller (1992). Total DNA from insects was obtained following the procedures of Batlle *et al.* (2008) and Garcia-Chapa *et al.* (2005). The DNA extracts were stored at -20C. The universal primers for phytoplasma detection, P1/P7 (Deng & Hiruki 1991; Smart *et al.*, 1996), were used during the first step and fO1/rO1 AP group-specific primers for the second (Lorenz *et al.*, 1995). The first amplification was in a

total volume of 20 μL containing 5–10 ng DNA and the following mixture: 0.25 μM each universal primer; 250 μM dNTPs; 1 U 100 μL^{-1} Taq DNA polymerase (Promega) and 1 μL Taq buffer. Two microliters of a 1:50 dilution of the first amplification product were used for the second step. The second amplification was at 0.375 μM of group-specific primers. The products were analysed by electrophoresis in a 1.5% D-1 agarose gel (Pronadisa) according to standard procedures. DNA was stained with ethidium bromide and exposed to ultraviolet light. Healthy *Prunus* and *Catharanthus roseus* seedlings were used as a negative control in PCR assays. To ensure 'Ca. P. prunorum' detection, an RFLP analysis of fO1/rO1 primer pair amplification products was performed with *RsaI* and *SspI* enzymes following (Lorenz *et al.*, 1995; Garcia-Chapa *et al.*, 2003).

Results

Incidence of 'Ca. P. prunorum' in orchards of stone fruit species

'Ca. P. prunorum' was detected on all of the cultivated *Prunus* species studied, except *P. avium* and *P. dulcis*, and in all four of the regions surveyed (Table 1). The most affected and symptomatic species was *P. salicina*, which exhibited early bud break, leaf curling, yellowing, collapse and a complete loss of the harvest. Its visual incidence ranged from 1% in Valencia to more than 80% in some plots in the Baix Llobregat area (Table 1). Two plots of *P. domestica* were studied in Baix Llobregat: Santa Coloma 6 and 7. In the Santa Coloma 6 plot, 'Reina Claudia' presented a visual incidence of 2%, confirmed by PCR on the four trees with symptoms analysed. However, PCR analysis of the infection rate on samples randomly collected from the six symptomless trees was 2+/6. In the Santa Coloma 7 plot, the traditional local variety of *P. domestica* 'Colló de Mico' was completely symptomless, but PCR analysis gave an infection rate of 4+/10. The visual incidence of *P. persica* was low, with PCR analyses of infection rates ranging from 0 to 4%, on all the plots except Encomienda 1 and 2 in the Vegas Altas area (Extremadura), where the incidence was as high as 25% (Table 1). The main symptoms observed on peach were leaf yellowing, curling and in some cases collapse. There were no symptoms and ESFY was not detected in the five *P. avium* and three *P. dulcis* plots, even in areas with high infection pressure. Three commercial plots of *P. cerasifera* were studied, one a pollinator within a highly

affected *P. salicina* orchard (Olesa 4). No clear ESFY symptoms were observed on *P. cerasifera* in any of the cases, but 'Ca. P. prunorum' was detected by PCR in 22 of the 30 symptomless trees randomly collected in the three plots (Table 1). ESFY incidence and dissemination were very high in the Baix Llobregat area of Catalonia, where the phytoplasma was present in all the plots of *P. salicina*, *P. domestica*, *P. cerasifera*, *P. armeniaca* and *P. persica* surveyed. In the Ribera d'Ebre area, the incidence was more than 30% on *P. salicina* in the Miravet 1 and 2 plots. In the Lleida area, ESFY was only detected in one *P. salicina* orchard (Borges 2) (Table 1). The incidence of ESFY in Valencia and Aragon was very low, ranging in both cases from 1 to 7%, even in very susceptible species. In Extremadura, ESFY was present in all except a *P. dulcis* orchard (Lobón). The visual incidence was low in the Vegas Bajas area and high in the Vegas Altas area, up to 25% in some plots (Table 1).

***C. pruni* captures and 'Ca. P. prunorum' infection rate in *Prunus* spp. orchards**

C. pruni was captured by yellow sticky traps in all four of the regions studied, but not in all of the fruit growing areas. The beating method was not successful in *P. salicina* and *P. cerasifera* orchards in the Baix Llobregat, with zero captures, while it proved to be effective for wild *P. mahaleb* growing nearby. In the Ribera d'Ebre area of Tarragona (Catalonia), a peak of 1.75 individuals per trap was captured in a *P. salicina* plot (Miravet). No *C. pruni* were captured in the Lleida area (Borges and Alcarràs), or in the Torres de Berrelén plot in Aragón and the Barxeta plot in Valencia. In the other plots in Aragon, the number of *C. pruni* captures was very low with a maximum of 0.75 and 0.5 individuals per trap in the Montañana and Alagón plots, respectively. Peaks of capture in the Belgida and Llutxent plots (Valencia) were 0.25 and 0.5 individuals per trap, respectively. The *C. pruni* captures in Extremadura rose to a maximum of 12 insects per trap in 2006 (Fig. 3). *C. pruni* adults mainly appeared in the middle of February, but, in warm winters, in some years and plots such as in the Baix Llobregat area in 2004, they appeared in January (Fig. 1). The *C. pruni* peaks were very variable in the date and the number of captures between the years. In the *P. mahaleb* of Torrelles plot, the remigrant peak ranged from 15 March in 2004 to 15 April in 2006, and the captures ranged from 11 individuals per trap in 2003 to 3.75 in 2005. The emigrant peaks commonly appeared in early June, with captures lower than in

remigrant peaks. The date of peaks in the nearby St. Vicenç and Sta. Coloma plots of *P. salicina* were very similar, but the captures were lower, especially in the remigrant peaks (Figs 1, 2 & 3). In Extremadura, only one clear peak was observed, between 1 March and 15 July, on 15 May in 2005 and 1 May in 2006. These peaks were of emigrant individuals, with remigrant individuals only captured in March 2005. The captures in plots and regions with very low populations only differed slightly, but it was difficult to track the peaks due to the low level of captures. In the two *P. salicina* plots in the Baix Llobregat, there were differences between the corners and the central part of the orchard, with captures in central traps being very low (Fig. 4). 'Ca. P. prunorum' was detected in *C. pruni* in all of the regions studied. In the Ribera d'Ebre (Miravet), 'Ca. P. prunorum' was detected in around 7% of the insects. In Aragon, Valencia and Extremadura, 'Ca. P. prunorum' was detected in 4, 5 and 9% of the insects, respectively. There were no significant differences in infection rates between insects captured on different species in the same area. Analysing the *C. pruni* infection rate throughout the season in Baix Llobregat (Catalonia), the highest level of carriers corresponded to remigrants in late winter (March) with infection rates of around 40%. In the new generations of young emigrant adults (June) the infection rate fell to approximately 10% (Fig. 5).

Study of 'Ca. P. prunorum' and *C. pruni* on wild *Prunus* species

The wild *Prunus* species were surveyed for 'Ca. P. prunorum' and *C. pruni* in three stone fruit producing areas in Catalonia. The highest captures in all the study were on a wild *P. mahaleb* plot in the Baix Llobregat area (Barcelona), with a maximum mean up to 13 insects per trap in 2006 (Fig. 3). No symptoms were observed on any wild or naturalized *P. mahaleb*, *P. spinosa*, *P. cerasifera*, *P. dulcis* and *P. domestica* sampled. In the Lleida area, wild *P. spinosa* communities studied were not infected, and no *C. pruni* was captured by beating or yellow sticky traps. In this area, in analyses of naturalized *P. dulcis* near the plots there was no *C. pruni* capture or phytoplasma detection. In the Ribera d'Ebre area (Tarragona), a small community of wild *P. mahaleb* had the same negative results (Table 2). In the coastal mountains of Barcelona, 'Ca. P. prunorum' and *C. pruni* were found on different wild hosts. In Cabrils plots, some *C. pruni* individuals were captured by beating on *P. spinosa*, but

no 'Ca. P. prunorum' were detected in either plants or insects (Table 2). In Begues plots, the *P. cerasifera*, *P. spinosa* and *P. mahaleb* communities found were very small and scattered. A few *C. pruni* individuals were found on these *P. spinosa*, but no 'Ca. P. prunorum' was detected on either plants or insects. In Torrelles sampling points, there was a high 'Ca. P. prunorum' infection rate in the communities of *P. mahaleb*, and major *C. pruni* infected populations, showing a high hosting capacity. Here, the phytoplasma was detected in 16 out of 30 *P. mahaleb* tested and in two naturalized *P. domestica* (Table2).

Discussion

This study presents extensive data on the hosts and vectors of 'Ca. P. prunorum' in Spain, demonstrating that it is widespread in all of the regions studied. While part of the data in this study is ten years old, but it still represents the general situation in the different areas. The regional phytopathological surveillance programmes for quarantine diseases, carried out recently, showed that the ESFY geographic distribution and incidence presented is still valid. 'Ca. P. prunorum' continues to be mainly present in the Baix Llobregat in Catalonia and Vegas Altas in Extremadura. In the other areas there are sporadic cases and very low incidences. These results confirm the many and continuous reports which date back to the beginning of the twentieth century. Sala reported, in 1935, early shoot growth on *P. salicina* in the Baix Llobregat area. In Valencia in the 1970s and 1980s there were some outbreaks on *P. salicina* and *P. armeniaca*: nowadays cases are isolated (Sanchez-Capuchino & Forner, 1973; Llácer *et al.*, 1986). In the last decade, recurrent ESFY outbreaks and *C. pruni* have been reported in the Baix Llobregat area, conditioning *P. salicina* cultivation (Laviña *et al.*, 2004, Torres *et al.*, 2004). *P. dulcis* and *P. avium* were not infected, even in high-infection pressure areas such as Baix Llobregat (Catalonia), and confirm these species as poor hosts. *P. mahaleb* and *P. cerasifera* had high infection rates without symptoms. *P. armeniaca* and *P. salicina* were the most affected, showing clear symptoms and great damage. In general, there is a low incidence in *P. persica*, except in Extremadura, where incidence is high. These results are similar to those obtained in previous studies (Giunchedi *et al.*, 1982; Jarausch *et al.*, 2001; Jarausch *et al.*, 2008).

There is disagreement between visual incidence and PCR-infection rate that could be due to the condition of the trees when the samples were taken. This is the case for the *P. salicina* and *P. armeniaca* plots of Sta. Inés, Torres de Berrelén and Benissanet 1, with clear symptoms of phenological mismatch in spring. These samples had to be taken in September from collapsed trees due to the low number of trees with symptoms available. On *P. persica*, some symptomatic negative trees were also collapsed, but this low correlation could be due to confusion with other biotic and abiotic factors, On *P. persica*, other factors could not be discriminated due to the lack of specific symptoms showing phenological mismatch in this species. This is the case for the Extremadura peach plots, where the real 'Ca. P. prunorum' incidence was probably slightly lower. The incidence and damage were high in Baix Llobregat (Catalonia) and Vegas Altas (Extremadura) areas, in agreement with the highest *C. pruni* captures. The low incidence in Valencia, Aragon and Lleida is associated with very low *C. pruni* populations and confirmed the limited 'Ca. P. prunorum' presence in these areas, even on very susceptible species such as *P. salicina* and *P. armeniaca*. The low ESFY incidence and *C. pruni* captures are probably related to a lack of potential wild hosts and overwintering refugee plants in the plains. The results show an association between high ESFY incidence areas, large *C. pruni* populations and availability of wild hosts. In the Baix Llobregat area, results pointed to *P. mahaleb* as a wild symptomless host, with a high infection rate and capacity to host *C. pruni*. The *P. spinosa* infection rate was lower, as in other countries (Yvonne *et al.*, 2004; Maier *et al.*, 2013). The infected *P. mahaleb* plots of Torrelles are located only 2 km from the high incidence *P. salicina* plots in Sta. Coloma and St. Vicenç. Although *P. mahaleb* could play an important role in local pathological cycles, studies of this species in Italy have revealed very low infection rates and capacities to host this vector (Carraro *et al.*, 2002). *P. mahaleb* was not considered a common natural host for 'Ca. P. prunorum' (Carraro *et al.*, 2004), but sporadic cases of 'Ca. P. prunorum' have been reported in regions of Italy such as Trentino, even showing symptoms (Pignatta *et al.*, 2008). These differences between the hosting capacity *P. mahaleb* communities could be due to the different *C. pruni* biotypes in Spain (Peccoud *et al.*, 2013) or to the genetic differences between the *P. mahaleb* communities. *P. mahaleb* was infected in the three plots of Torrelles, while in Begues and Cardó tested negative, showing an irregular hosting

behavior. It is important to point out that some *P. mahaleb* are naturalized rootstocks that could belong to different varieties. In Vegas Altas there is a high incidence, but no large wild *Prunus* communities within 50 km. It could be that *C. pruni* may have been hosted here by rare, small and distant communities of *P. spinosa* or by cultivated *Prunus* spp. Another hypothesis is that the perennial relict endemism *P. lusitanica*, 50 km from the Vegas Altas area in the Guadalupe Mountains, could be the host. These *P. lusitanica* communities, now under study, are larger and closer than other wild *Prunus* spp. Previous studies have reported that other perennial *Prunus* species, such as *P. laurocerasus*, are poor hosts for *C. pruni* and 'Ca. P. prunorum', but they were experimentally infected (Carraro *et al.*, 2004). The *C. pruni* dynamics gave two population peaks, corresponding to remigrant and emigrant individuals, confirming the behavior observed for *C. pruni* in other European countries (Labonne & Lichou, 2004; Jarausch *et al.*, 2008). In the Baix Llobregat area, the higher captures of *C. pruni* on wild *P. mahaleb* than in *P. salicina* orchards, were probably due to host species preferences of *C. pruni* and to the insecticide treatments used on the commercial plots. While insecticide treatments do not kill all *C. pruni* in commercial orchards, they probably reduce the population to levels difficult to track, but enough to produce very high incidences. Our results showed that *C. pruni* fed and developed on wild hosts outside the commercial plots, although untreated or deserted orchards could play also an important role (Thebaud *et al.*, 2006, 2009). Yellow sticky traps were a good method for trapping *C. pruni* in commercial orchards with low populations. Zero captures were obtained when the striking method was used on commercial plots of *P. salicina* and *P. cerasifera* in the Baix Llobregat area. The capture peaks are variable in dates and number of captures, from year to year. Comparing the captures between *P. mahaleb* and *P. salicina*, the dates of the two peaks are similar, but the remigrants peak is generally greater than the emigrants peak on *P. mahaleb*, the opposite being the case on *P. salicina*.

Comparing the vector dynamics between Extremadura and Catalonia, the tendency is that the emigrant peak appears one month earlier in Extremadura. This cannot be fully confirmed, because winter trapping in Extremadura was not successful due to variable circumstances and the remigrants peak was not clearly observed. This peak probably

appeared in February, one month earlier than in Catalonia, as for the emigrants peak, but the loss of the traps means this cannot be confirmed. It is possible that the remigrant captures in the first peak were very low. The results gave the percentage of remigrant individuals as carriers of the phytoplasma in the Baix Llobregat at around 40%, in contrast to an average of less than 10% of young emigrants from April to June. This was probably due to the remigrant individuals being most infected because they had had more time to incubate the phytoplasma. This is supported by the transmission efficiency of the remigrants being much higher than for emigrants, suggesting that *C. pruni* completes latency in its secondary overwintering hosts (Thebaud *et al.*, 2009). These infection rates are higher than in other countries, but it should be taken into consideration that our data was obtained by nested-PCR in contrast with other studies (Jarausch *et al.*, 2001; Carraro *et al.*, 2004; Jarausch *et al.*, 2008). ESFY epidemics and damage in Spain can be divided in two major patterns: low and high impact. Low impact epidemics can be found in Valencia, Aragon, and Lleida (Catalonia), characterised by generally low incidence and *C. pruni* populations. In general, there are no major hosts for the vector or 'Ca. P. prunorum' within 50 km of the orchards. High impact epidemics occur in the Baix Llobregat area of Catalonia and are associated with high incidence and levels of damage in the orchards; this area is characterised by populations of infected wild *P. mahaleb* hosting large populations of infective *C. pruni*. These findings for *P. mahaleb* (high 'Ca. P. prunorum' infection rates and high *C. pruni* hosting capacities) combined with the poor results for *P. spinosa*, suggest a major role for *P. mahaleb* in the ESFY cycle in this area.

Historical ESFY reports, the long history of stone fruit cultivation, and the tolerance of traditional varieties and wild *Prunus spp.* in the Baix Llobregat area, indicate co-adaptation between 'Ca. P. prunorum, the autochthonous *Prunus* species/varieties and *C. pruni*. For this reason, the introduction of such a very sensitive species as *P. salicina*, unleashed a major epidemic and economic loss. The identification of 'Ca. P. prunorum' on isolated wild or naturalized individuals of *P. domestica* and *P. cerasifera* indicates that these species could play a secondary role in the epidemiology. Based on these results, *P. mahaleb* communities could hold the key for the control of the disease in the Baix Llobregat area. Here, the main action to fight against ESFY has

substituting *P. salicina* by the tolerant *P. cerasifera* and *P. domestica*, remaining productive despite infection. Other control actions undertaken have been the elimination of deserted *Prunus* spp. near the orchards and insecticide treatments before flowering directed at remigrant *C. pruni*. These measures could not be fully implemented because of the impossibility of completely removing wild *Prunus* spp. and the insecticide safety margin for flowering required for bee protection.

In conclusion, these data show that ESFY is widely distributed in Spain, but generally with low incidences. It is important to take into consideration that Spain is in the southern border region of ESFY and any climatic change will move the limit of distribution of the wild and cultivated *Prunus* spp. and therefore *C. Pruni* and 'Ca. P. prunorum' distribution. In fact, the lower incidence and spread in Valencia found in this study compared to the 1980s (Llácer *et al.*, 1986) is probably due to this climate change. It could be that this area is the southern limit for ESFY in Mediterranean climate zones, but more complete studies are required to establish this limit in continental climate areas such as Extremadura. This border effect, the climate change and the adaptation of vectors and plants, are very important factors for predicting future risks. Large-scale outbreaks and their duration should make us aware of the possibility of destructive episodes in Spain. Future studies of ESFY should focus on characterization of the pathological cycle that led to the outbreak on peach trees in Extremadura and to develop better control strategies for ESFY and its vector *C. pruni*.

Acknowledgements

This study was funded by grants RTA04-066 and RTA 09-070 from the Programa Sectorial de I+D, MAPA, Spain. We would like to thank Remedios Santiago from SPV Junta de Extremadura, Rafael Balduque from SIA, Zaragoza (Aragón), Joan Català from Estación Experimental Agraria of Llutxent (Valencia) and Andreu Vila from Associació defensa vegetal del Baix Llobregat (Catalonia) for their help in identifying the plots and conducting the surveys.

References

- 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, 828–32.
- Batlle A, Altabella N, Sabaté J, Laviña A, 2008. Study of the transmission of stolbur phytoplasma to different crop species, by *Macrostelus quadripunctulatus* (Kirschbaum). *Annals of Applied Biology* 152, 235–42.
- Carraro L, Osler R, Loi N, Ermacora P, Refatti E, 1998. Transmission of European stone fruit yellows phytoplasma by *Cacopsylla pruni*. *Journal of Plant Pathology* 80, 233–9.
- Carraro L, Ferrini F, Ermacora P, Loi N, 2002. Role of wild *Prunus* species in the epidemiology of European stone fruit yellows. *Plant Pathology* 51, 513–7.
- Carraro L, Ferrini F, Ermacora P, Loi N, 2004. Transmission of European stone fruit yellows phytoplasma to *Prunus* species by using vector and graft transmission. *Acta Horticulturae* 657, 449–53.
- Cieslinska M, 2011. European stone fruit yellows disease and its causal agent 'Candidatus Phytoplasma prunorum'. *Journal of Plant Protection Research* 51, 441–7.
- Danet JL, Balakishiyeva G, Cimerman A *et al.*, 2011. Multilocus sequence analysis reveals the genetic diversity of European fruit tree phytoplasmas and supports the existence of inter-species recombination. *Microbiology* 157, 438–50.
- Deng S, Hiruki C, 1991. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and non-culturable mollicutes. *Journal of Microbiological Methods* 14, 53–61.
- García-Chapa M, Laviña A, Sanchez I, Medina V, Batlle A, 2003. Occurrence, symptom expression and characterization of phytoplasma associated with pear decline in Catalonia (Spain). *Journal of Phytopathology* 151, 584–90.

- García-Chapa M, Sabaté J, Laviña A, Batlle A, 2005. Role of *Cacopsylla pyri* in the epidemiology of pear decline in Spain. *European Journal of Plant Pathology* 111, 9–17.
- Giunchedi L, Poggi Pollini C, Credi R, 1982. Susceptibility of stone fruit trees to the Japanese plum-tree decline causal agent. *Acta Horticulturae* 130, 285–90.
- Hodkinson ID, White IM, 1979. *Homoptera. Psylloidea. Handbooks for the Identification of British Insects*. Vol. II, part 5(a). London, UK: Royal Entomological Society of London.
- Jarausch W, Eyquard JP, Lansac M, Mohns M, Dosba F, 2000. Susceptibility and tolerance of new French *Prunus domestica* cultivars to European stone fruit yellows phytoplasma. *Journal of Phytopathology* 148, 489–93.
- Jarausch W, Danet JL, Labonne G *et al.*, 2001a. Mapping the spread of apricot chlorotic leaf roll (ACLR) in southern France and implication of *Cacopsylla pruni* as a vector of European stone fruit yellows (ESFY) phytoplasmas. *Plant Pathology* 50, 782–90.
- Jarausch B, Mühlenz I, Beck A, Lampe I, Harzer U, Jarausch W, 2008. Epidemiology of European Stone fruit yellows in Germany. *Acta Horticulturae* 781, 417–22.
- Kison H, Seemüller E, 2001. Differences in strain virulence of the European stone fruit yellows phytoplasma and susceptibility of stone fruit trees on various rootstocks to this pathogen. *Journal of Phytopathology* 149, 533–41.
- Labonne G, Lichou J, 2004. Data on the life cycle of *Cacopsylla pruni*, Psyllidae vector of European stone fruit yellows (ESFY) phytoplasma, in France. *Acta Horticulturae* 657, 465–70.
- Laviña A, Sabaté J, García-Chapa M, Batlle A, Torres E, 2004. Occurrence and epidemiology of European stone fruit yellows phytoplasmas in Spain. *Acta Horticulturae* 657, 489–94.

- Lederer W, Seemüller E, 1992. Demonstration of mycoplasmas in *Prunus* species in Germany. *Journal of Phytopathology* 134, 89–96.
- Llácer G, Medina V, Archelos D, 1986. Investigaciones sobre la detección, difusión natural y control del enrollamiento clorótico del albaricoquero. *Boletín Sanidad Vegetal de Plagas* 12, 181–207.
- Lorenz KH, Dosba F, Poggi Pollini C, Llácer G, Seemüller E, 1994. Phytoplasma diseases of *Prunus* species in Europe are caused by genetically similar organisms. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 101, 567–75.
- Lorenz KH, 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, 771–6.
- Maier C, Bachinger K, Mörtel J, Engel C, Czipin L, Riedle-Bauer M, 2013. European stone fruit yellows in Austria: epidemiological observations and a mark and recapture experiment tracking the dispersal of its vector *Cacopsylla pruni* (Hemiptera: Psyllidae) in a model apricot orchard. *Journal of Phytopathology* 161, 713–22.
- Marcone C, Jarausch B, Jarausch W, 2010. 'Candidatus Phytoplasma prunorum', the causal agent of European stone fruit yellows, an overview. *Journal of Plant Pathology* 92, 19–34.
- Peccoud J, Labonne G, Sauvion N, 2013. Molecular test to assign individuals within the *Cacopsylla pruni* complex. *PLoS ONE* 8, e72454.
- Pignatta D, Forno F, Giunchedi L *et al.*, 2008. A real time PCR assay for the detection of European stone fruit yellows phytoplasma ('Ca. P. prunorum') in plant propagation material. *Acta Horticultrae* 781, 499–504.
- Sala R, 1935. *El Ciruelo y su Cultivo*. Barcelona, Spain: Salvat Editores.

- Sanchez-Capuchino JA, Forner JB, 1973. Vegetative disorders in Japanese plum trees on myrobalan rootstocks in the province of Valencia (Spain). *Acta Horticulturae* 44, 93–7.
- Seemüller E, Schneider B, 2004. 'Candidatus Phytoplasma mali', 'Candidatus Phytoplasma pyri' and 'Candidatus Phytoplasma prunorum', the causal agents of apple proliferation, pear decline and European stone fruit yellows, respectively. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54, 1217–26.
- Smart CD, Schneider B, Blomquist CL *et al.*, 1996. Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of the 16S-23S rRNA spacer region. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 1988–93.
- Steffek R, Follak S, Sauvion N, Labonne G, MacLeod A, 2012. Distribution of 'Candidatus Phytoplasma prunorum' and its vector *Cacopsylla pruni* in European fruit-growing areas: a review. *EPPO Bulletin* 42, 191–202.
- Thebaud G, Sauvion N, Chadoeuf J, Dufils A, Labonne G, 2006. Identifying risk factors for European stone fruit yellows from a survey. *Phytopathology* 96, 890–9.
- Thebaud G, Yvon M, Alari R, Sauvion N, Labonne G, 2009. Efficient transmission of 'Candidatus Phytoplasma prunorum' is delayed by eight months due to a long latency in its host-alternating vector. *Phytopathology* 99, 265–73.
- Torres E, Martín MP, Paltrinieri S, Vila A, Masalles R, Bertaccini A, 2004. Spreading of ESFY phytoplasmas in stone fruit in Catalonia. *Journal of Phytopathology* 152, 432–7.
- Yvon M, Labonne G, Thebaud G, 2004. Survival of European stone fruit yellows phytoplasma outside fruit crop production areas: a case study in southeastern France. *Acta Horticulturae* 657, 477–81.

Table 1: Visual incidence and PCR detection of 'Ca. P. prunorum' on different cultivated *Prunus* spp. in 2005.

Plot / <i>Prunus</i> spp.(Var./Age)	Visual incidence(PCR-Detection)	Plot / <i>Prunus</i> spp.(Var./Age)	Visual incidence(PCR-Detection)
ARAGON		Ribera d'Ebre area	
Santa Inés <i>Ps</i> (Angeleno/9)	5%(6+/10)	Miravet1 <i>Ps</i> (Angeleno/16)	37%(9+/10)
Alagón <i>Ps</i> (Sungold/15)	6%(8+/10)	Miravet2 <i>Ps</i> (LarryAnn/16)	32%(10+/10)
Torres Berrelén <i>Ps</i> (Pioneer/19)	7%(6+/10)	Benissanet1 <i>Pa</i> (Moniqui/20)	7%(6+/10)
CATALONIA		Benissanet2 <i>Pp</i> (SnowQueen/9)	1%(3+/10)
Baix Llobregat area		Ginestar <i>Pa</i> (Bulida/24)	5%(8+/10)
Olesa1 <i>Ps</i> (606/12)	63%(8+/10)	Lleida area	
Olesa2 <i>Ps</i> (Fortune/12)	74%(10+/10)	Alcarràs1 <i>Pp</i> (Babygold/10)	1%(0+/10)
Olesa3 <i>Ps</i> (AnneGold/12)	59%(9+/10)	Alcarràs2 <i>Pp</i> (Catherin/15)	0%(0+/10)
Olesa4 <i>Pc</i> (Pollinator/12)	0% (10+/10)	Borges1 <i>Pp</i> (TopLady/8)	0%(0+/10)
Castellbisbal <i>Pa</i> (Moniqui/25)	8%(8+/10)	Borges2 <i>Ps</i> (Angeleno/4)	15%(7+/10)
Sant Boi1 <i>Ps</i> (BlackAmber/15)	45%(8+/10)	Borges3 <i>Pdu</i> (Texas/21)	0%(0+/10)
Sant Boi2 <i>Pc</i> (Valentins/50)	0%(4+/10)	VALENCIA	
Santa Coloma1 <i>Pp</i> (Babygold/10)	4%(2+/10)	Belgida <i>Pa</i> (Canino/11)	1%(3+/10)
Santa Coloma2 <i>Ps</i> (AutumnGiant/8)	61%(9+/10)	Llutxent <i>Pa</i> (Moniqui/18)	2%(2+/10)
Santa Coloma3 <i>Ps</i> (Fortune/15)	82%(7+/10)	Barxeta <i>Ps</i> (GoldenJapan/8)	1%(1+/10)
Santa Coloma4 <i>Ps</i> (AnneGold/8)	63%(10+/10)	EXTREMADURA	
Santa Coloma5 <i>Pc</i> (Llevadó/60)	0%(8+/10)	Vegas Altas area	
Santa Coloma6 <i>Pd</i> (Claudia/25)	2%(6+/10)	Encomienda1 <i>Pp</i> (SpringCrest/12)	25%(7+/10)
Santa Coloma7 <i>Pd</i> (CollóMico/35)	0%(4+/10)	Encomienda2 <i>Pp</i> (MayCrest/12)	23%(6+/10)
Santa Coloma8 <i>Pav</i> (Burlat/30)	0%(0+/10)	Zurbarán1 <i>Ps</i> (606/10)	8%(8+/10)
Torrelles1 <i>Pav</i> (Summit/15)	0%(0+/10)	Zurbarán2 <i>Ps</i> (RedBeaut/10)	10%(6+/10)
Torrelles2 <i>Pav</i> (Burlat/25)	0%(0+/10)	Zurbarán3 <i>Pp</i> (SnowQueen/10)	5%(5+/10)
Torrelles5 <i>Pdu</i> (Marcona/20)	0%(0+/10)	Vegas Bajas area	
Begues1 <i>Pav</i> (Burlat/25)	0%(0+/10)	Lobón <i>Pdu</i> (Texas/16)	0%(0+/10)
Begues2 <i>Pav</i> (4.70/10)	0%(0+/10)	Valdelcalzada1 <i>Ps</i> (606/8)	8%(5+/10)
Sant Vicenç1 <i>Ps</i> (BlackDiamond/10)	76%(9+/10)	Valdelcalzada2 <i>Ps</i> (BlackStar/8)	5%(7+/10)
Sant Vicenç2 <i>Ps</i> (Pioneer/15)	24%(10+/10)	Valdelcalzada3 <i>Pp</i> (SpringCrest/8)	4%(1+/10)

Abbreviations:*Pa*(*Prunus armeniaca*);*Pav*(*P. avium*);*Pc*(*P. cerasifera*);*Pd*(*P. domestica*);*Pdu*(*P. dulcis*);*Pp*(*P. persica*);*Ps*(*P. salicina*).

Table 2. 'Ca. P. prunorum' infection rate and *C. pruni* captures in different wild asymptomatic *Prunus* spp. communities in Catalonia in 2009 and 2010. Barcelona (B), Tarragona(T) Lleida(L) provinces.

(Province) Plot/ <i>Prunus</i> spp.	PCR Detection Trees	<i>C. pruni</i> capture method	PCR-Detection Insects
(B) StVicenç <i>P. domestica</i>	2+/2	Beating	No Captures
(B) Torrelles1 <i>P. mahaleb</i>	7+/10	Yellow/Beating	15+/69
(B) Torrelles2 <i>P. mahaleb</i>	4+/8	Yellow/Beating	8+/44
(B) Torrelles3 <i>P. mahaleb</i>	3+/5	Yellow/Beating	9+/25
(B) StaColoma <i>P. cerasifera</i>	2+/3	Beating	No Captures
(B) Begues1 <i>P. spinosa</i>	0/3	Yellow/Beating	0/4
(B) Begues2 <i>P. spinosa</i>	0/4	Beating	No Captures
(B) Begues3 <i>P. cerasifera</i>	0/3	Beating	No Captures
(B) Begues4 <i>P. mahaleb</i>	0/2	Beating	No Captures
(B) Cabriils1 <i>P. spinosa</i>	0/5	Beating	No Captures
(B) Cabriils2 <i>P. spinosa</i>	0/4	Beating	0/2
(T) Cardó1 <i>P. mahaleb</i>	0/3	Beating	No Captures
(L) Balldellou <i>P. spinosa</i>	0/2	Beating	No Captures
(L) Baells <i>P. spinosa</i>	0/6	Yellow/Beating	No Captures
(L) Baells <i>P. dulcis</i>	0/7	Yellow/Beating	No Captures
(L) Alcarrás <i>P. dulcis</i>	0/4	Yellow/Beating	No Captures
(L) Borges <i>P. dulcis</i>	0/11	Beating	No Captures

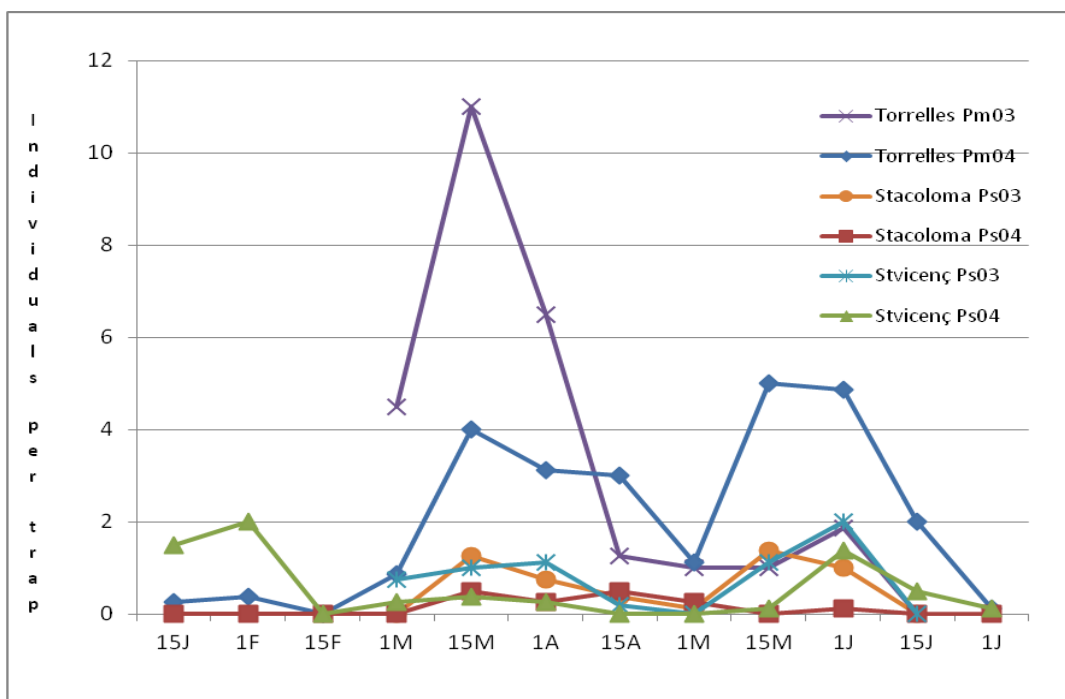


Figure 1. Evolution of the mean number of *C. pruni* individuals captured per trap in 2003 and 2004 on wild *P. mahaleb* (Pm) and in *P. salicina* (Ps) orchards in Baix Llobregat area (Catalonia).

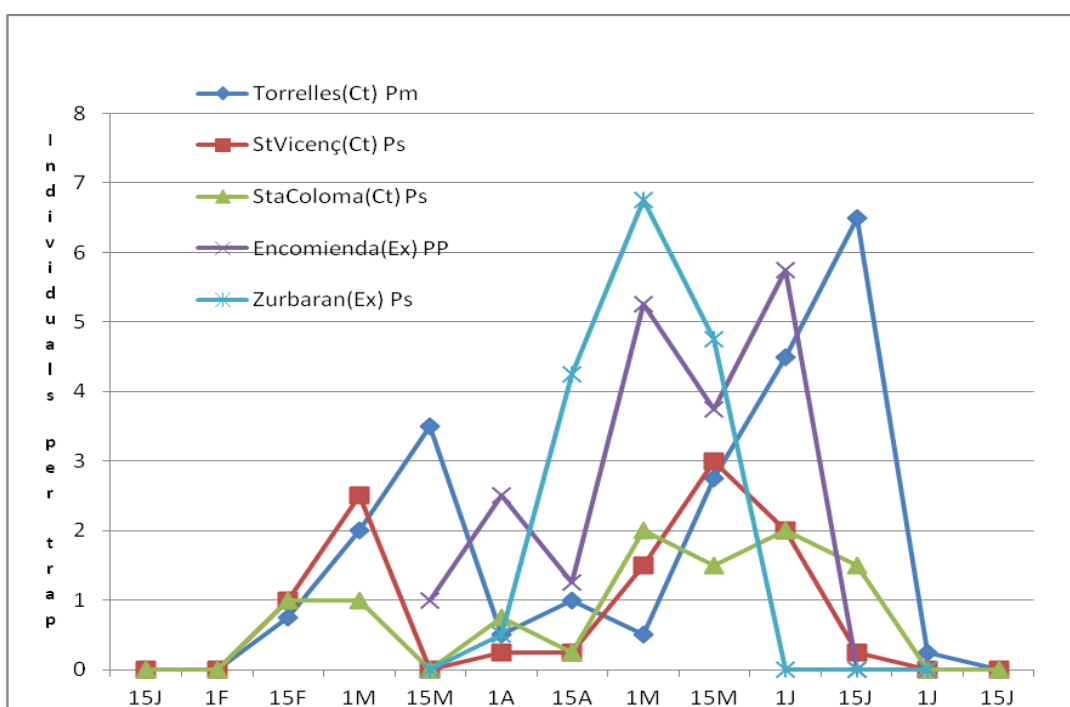


Figure 2. Evolution of the mean number of *C. pruni* individuals captured per trap in 2005 in the Baix Llobregat (Catalonia) and Vegas Altas (Extremadura) areas on wild *P. mahaleb* (Pm), *P. salicina* (Ps) and *P. persica* (Pp).

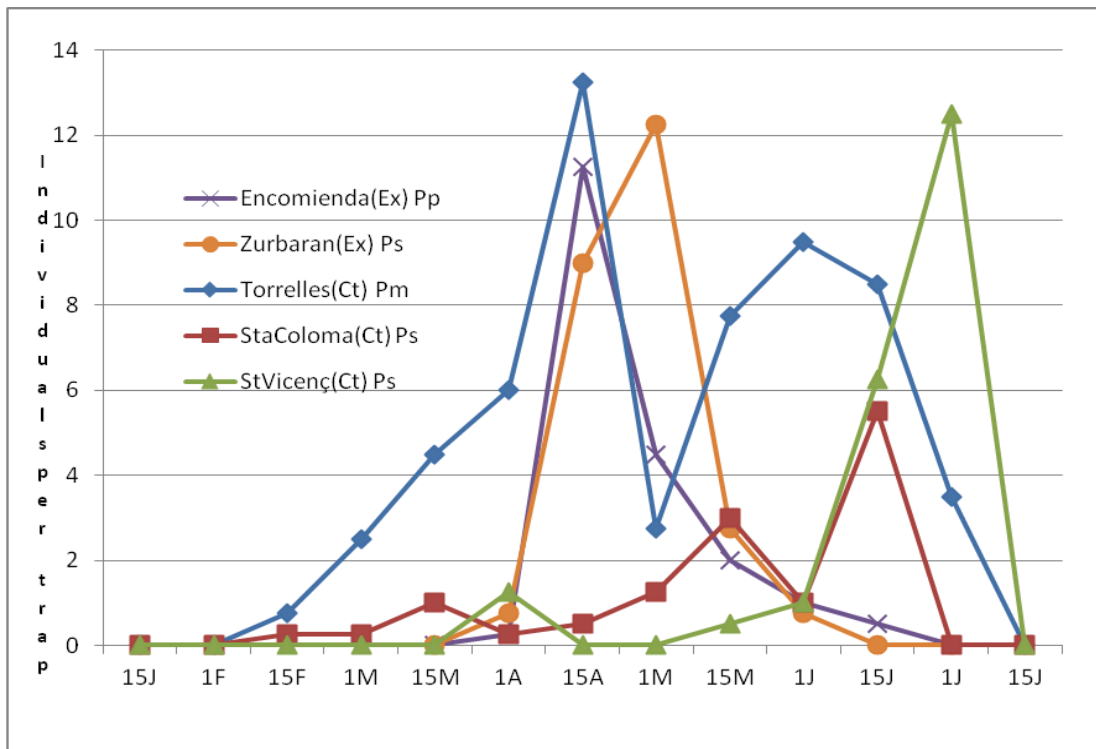


Figure 3. Evolution of the mean number of *C. pruni* individuals captured per trap in 2006 in the Baix Llobregat (Catalonia) and Vegas Altas (Extremadura) areas on wild *P. mahaleb* (Pm), *P. salicina* (Ps) and *P. persica* (Pp).

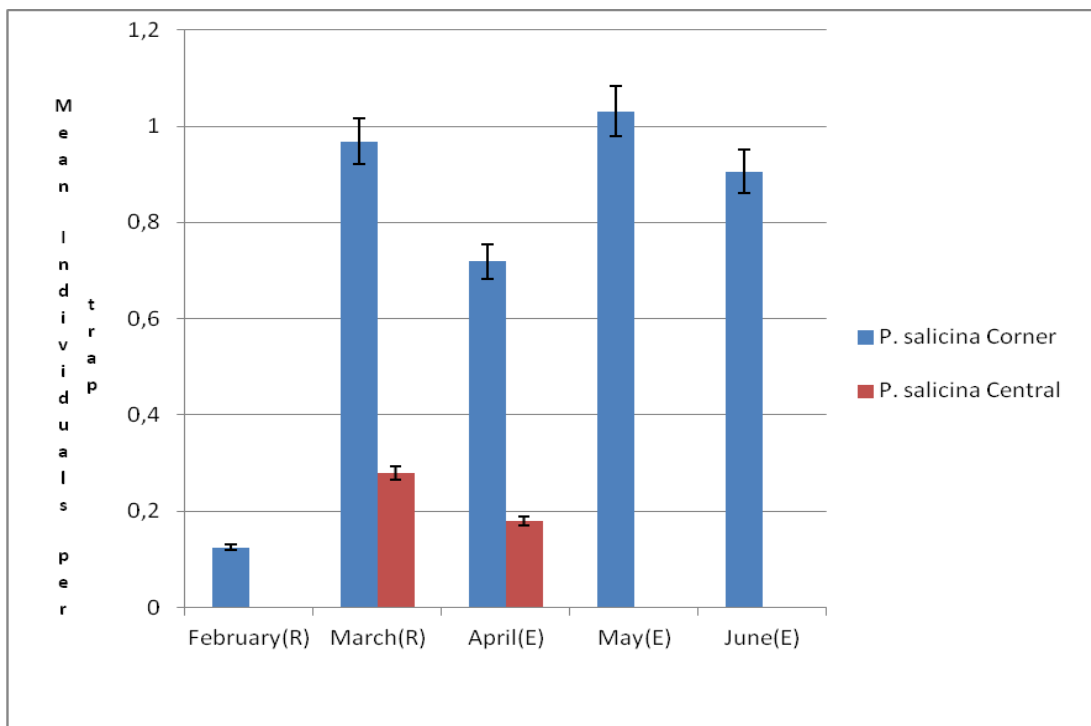


Figure 4. Mean number of *C. pruni* individuals captured per trap in the central part and in the edges of two *P. salicina* orchards (St vicenç and Sta Coloma plots) in 2003 and 2004 in Baix Llobregat area.

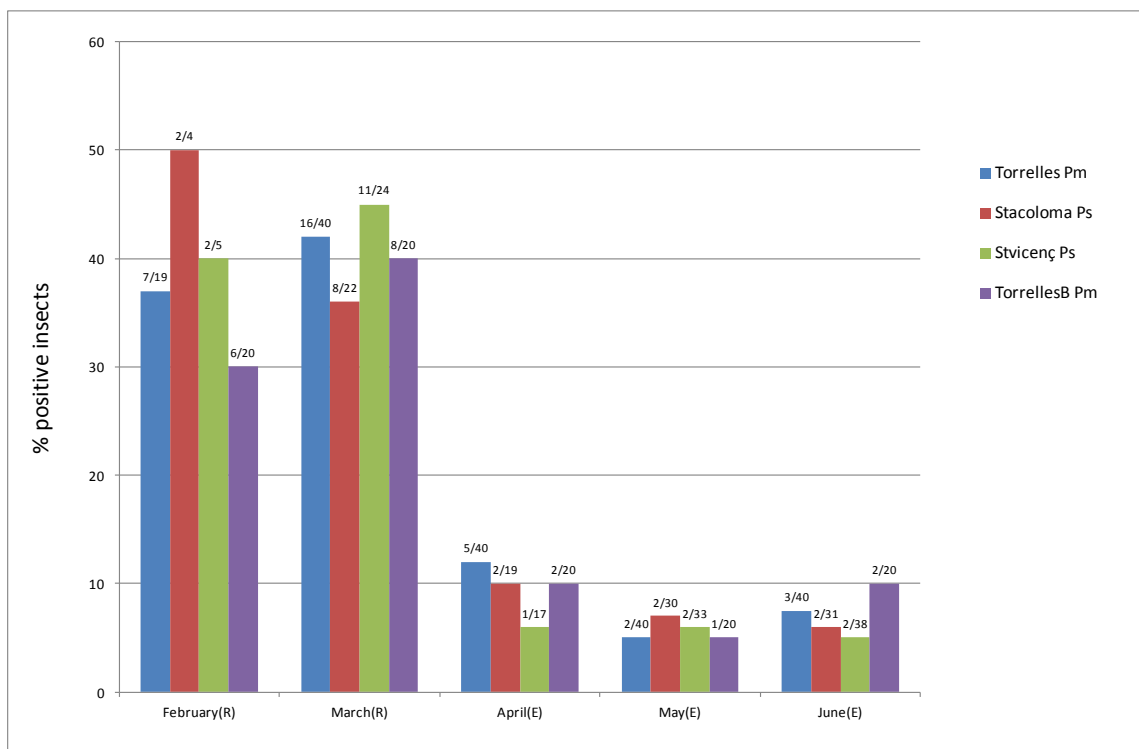


Figure 5. Percentage of *C. pruni* individuals carrying 'Ca. P. prunorum' on *P. salicina* (Ps) *P. mahaleb* (Pm) in the Baix Llobregat area in 2005 and 2006. Remigrants(R); Emigrants(E). All captured by yellow sticky traps except TorrellesB captured by beating.

Capítol 2. Epidemiologia de '*Candidatus Phytoplasma mali*'

Títol: Incidència i distribució de '*Candidatus Phytoplasma mali*' i els seus vectors potencials en cultius de pomera al nord d'Espanya

Article resumit

'*Candidatus Phytoplasma mali*' és l'agent causal de la malaltia de la Proliferació de la pomera o Apple proliferation (AP). Aquest fitoplasma afecta a la gran majoria d'espècies de *Malus*, ja siguin salvatges o cultivades. Actualment és una de les malalties més limitants per al conreu de la pomera a moltes parts d'Europa. 'Ca. P. mali' és present a les tres zones de clima atlàntic mostrejades (Astúries, País Basc i Navarra) en pomerars de sidra extensius. Les incidències eren baixes a Navarra, inferiors al 10%, altes a Astúries, entre el 15% i el 30%, i molt variables al País Basc, on pot arribar a variar entre un 0% i un 90 % en parcel·les properes. Aquestes incidències tant altes, han provocat importants pèrdues econòmiques, tant en quilos de collita, com en concentració de sucres, obligant alguns elaboradors de sidra a importar pomes per tal de mantenir el volum de producció. La baixa incidència de Navarra podria ser deguda a la poca edat de les plantacions mostrejades. A Catalunya, s'han mostrejat plantacions de pomera a tres zones agro-climàtiques diferents (Empordà, Baix Llobregat i Plana de Lleida) i no s'ha identificat cap arbre amb símptomes de la malaltia. Tampoc s'ha detectat 'Ca. P. mali' en els mostrejos aleatoris d'arbres sense símptomes clars o asimptomàtics. En les parcel·les afectades del Cantàbric, s'han observat diferències importants en les incidències varietals dins una mateixa parcel·la. Són un exemple d'aquesta variabilitat en la incidència varietal les parcel·les d'Aduna o Aizarnazabal 2, on la varietat Verde agria presentava incidències superiors al 60%, i Mozolua un 0 %, tenint ambdues varietats la mateixa edat i la mateixa pressió infectiva. Per altra banda Mozolua presentava incidències prou elevades a altres parcel·les, suggerint que no és una varietat sempre especialment tolerant. Podria explicar aquest fenomen, el fet que la varietat Mozolua no fos homogènia genèticament, i que hi hagués diversos llinatges amb diferents toleràncies, o bé, que s'estigui multiplicant material vegetal infectat. Les dues espècies de *Cacopsylla* per a les que s'ha demostrat que són vectors, *C. picta* i *C.*

melanoneura han estat capturades als pomerars del País Basc i Astúries mitjançant trampes grogues. Les captures més altes de *C. picta* es van produir al País Basc, on la incidència també era la més elevada. Les captures de *C. picta* a Astúries van ser molt baixes, i a Catalunya no es va identificar. *C. melanoneura* va ser capturada també a Catalunya, però només tres individus a Olesa, i al País Basc, només en una localitat i en una data de mostreig. Les captures d'aquesta espècie a Astúries van ser més altes i constants, essent també els únics punts de mostreig on els insectes eren portadors del fitoplasma, amb un 11% de mitjana de taxa d'infecció, ja que a Catalunya i al País Basc, els pocs individus capturats i analitzats, van resultar negatius. *C. picta* va resultar portadora de 'Ca. P. mali' als quatre punts de mostreig d'Astúries i el País Basc. Les taxes d'infecció van ser del 20% per als individus hivernants (remigrants) i el 15% per als adults joves de finals de primavera, indicant que els remigrants tenen major potencial d'infecció degut a que tenen més temps per a multiplicar el fitoplasma. *C. melanoneura* també presenta a Astúries unes taxes d'infecció superiors en els remigrants, però el nombre de captures no és suficientment gran com per a que aquests resultats siguin prou significatius. Els resultats obtinguts deixen clar que a les zones de clima Atlàntic el risc d'infecció és elevat i que pel moment, a les zones mediterrànies el risc d'infecció i dispersió és molt baix. També s'ha observat la necessitat de fer un programa de sanejament del material vegetal en multiplicació, així com de la necessitat de fer assajos de susceptibilitat de les varietats tradicionals de sidra, per a buscar fonts de tolerància genètica.

**INCIDENCE AND DISTRIBUTION OF 'CANDIDATUS
PHYTOPLASMA MALI' AND ITS POTENTIAL VECTORS IN
APPLE ORCHARDS IN NORTHERN SPAIN**

J. Sabaté, A. Laviña and A. Batlle

IRTA, Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries, Ctra Cabrils Km 2, 08348 Cabrils, Barcelona

ABSTRACT

'*Candidatus* Phytoplasma mali', the causal agent of the Apple proliferation (AP) disease, affects wild and cultivated *Malus* spp., and is one of the most important diseases for apple cultivation in Europe. 'Ca. P. mali' is known to be present in the three Atlantic regions of Spain surveyed in this study (Asturias, the Basque Country and Navarre) with different degrees of incidence, and our results showed that it is widespread in their extensive cider apple orchards, causing losses in total production and sugar concentration. Visual incidence in these Atlantic areas ranged from 0% to 92%. In contrast, it was not found in the intensive dessert apple orchards surveyed in the Mediterranean region of Catalonia. The two psyllid species reported as the vectors in Europe (*Cacopsylla picta* and *C. melanoneura*) were captured by yellow sticky traps. The highest *C. picta* captures were recorded in the Basque Country, where the disease incidence was also the highest, while in Asturias, the populations were very low. *C. picta* was positive for 'Ca. P. mali' in both these regions, with infection rates of 30% and 17% in Asturias and the Basque Country, respectively. No *C. picta* were captured in Catalonia. *C. melanoneura* was found in the apple orchards of all the regions, but in general with low captures. In Catalonia and the Basque Country, all *C. melanoneura* individuals were not positive for 'Ca. P. mali', and in Asturias the average infection rate was 11%.

INTRODUCTION

'*Candidatus Phytoplasma mali*' is the causal agent of Apple proliferation (AP), an incurable disease causing major losses to apple cultivation in Europe. 'Ca. P. mali' or (16SrX-A) gives the name to the ribosomal group X of the phytoplasmas (16SrX or AP group), and its genome was fully sequenced by Kube et al. in 2008. This group also includes 'Ca. P. prunorum' (16SrX-B) and 'Ca. P. pyri' (16SrX-C), affecting *Prunus* spp. and *Pyrus* spp. respectively (Lorenz et al. 1995; Seemüller and Schneider 2004; Danet et al. 2011). 'Ca. P. mali' symptoms are proliferation of side shoots, witches' broom, enlarged stipules, early break of buds, reddening in late summer, chlorosis, abnormal growth of fruits and decrease in vigor, yield and quality (Lorenz et al. 1995; Seemüller et al. 2007). 'Ca. P. mali' was first reported in Italy in 1950, by Rui et al. and now is widespread in most European countries causing important crop losses (Jarusch et al. 2011; Tedeschi et al. 2012). The first report of 'Ca. P. mali' found outside Europe was in Asian Turkey, by Canik and Ertunc in 2007. It is difficult to control, despite the use of healthy plant material, uprooting diseased trees and spraying insecticides. 'Ca. P. mali' is transmitted by vegetative multiplication and by psyllid vectors, with two species of the genus *Cacopsylla* identified as vectors: *Cacopsylla picta* (Foerster, 1848) (Frisinghelli et al. 2000) and *C. melanoneura* (Foerster, 1848) (Tedeschi and Alma 2004). In addition, 'Ca. P. mali' can be transmitted through root bridges (Ciccotti et al. 2007). The transmission role of every vector species is linked to the geographic distribution, host preferences and transmission efficiency. *C. picta* is the prevalent vector of 'Ca. P. mali' in most European countries, and its primary hosts are *Malus* spp. It has been captured carrying 'Ca. P. mali' in apple orchards in Germany, the Czech Republic, France, Italy and Switzerland (Frisinghelli et al. 2000; Jarusch et al. 2003; Baric et al. 2010). The primary host of *C. melanoneura* is *Crataegus monogyna* and occasionally *Malus* spp. and *Pyrus* spp. (Hodkinson and White 1979; Tedeschi et al. 2002; Mayer and Gross 2009). *C. melanoneura* has been reported as a vector of 'Ca. P. mali' in the Aosta Valley in north-western Italy, while in areas of Italy such as Trentino, the main vector is *C. picta*. The different vectoring capacities are probably related to different host-races of *C. melanoneura* (Malagnini et al. 2013). The role of *C. melanoneura* as a vector of 'Ca. P. mali' in a specific area is limited by the transmission efficiency, the affinity of the insects for the apple trees and the infection rates of its

main host, *C. monogyna*. (Tedeschi et al. 2002; Mayer et al. 2009; Baric et al. 2010). The two vector species are univoltines and overwinter on conifers. In the Aosta Valley, *C. melanoneura* overwinters between 1300 and 1600 m altitude, preferably on *Abies alba* (Pizzinat et al. 2011). They leave the reproduction hosts in early summer as emigrants to over-winter in conifers, returning to the reproduction hosts as remigrants to match and lay eggs in early spring. This migratory behavior, together with the fact that emigrant individuals visit affected apple trees in search of an overwintering refuge, allows considerable spread and the infection of new orchards by 'Ca. P. mali' (Mayer et al. 2010; Baric et al. 2010). In Spain, 'Ca. P. mali' is an emerging disease in cider apple orchards in the oceanic climate regions of Asturias, the Basque Country and the north of Navarre. The aim of the present study was to improve knowledge on the incidence, distribution, cycle and vectors of 'Ca. P. mali' in the apple varieties and agro-ecological conditions in Spain, and to identify the risk of dispersal in Mediterranean and continental areas where the disease has not been reported. The results obtained will help to improve control strategies, to reduce damage and also to manage the risk of outbreaks and dispersal.

MATERIALS AND METHODS

Incidence of 'Ca. P. mali' in apple orchards in Spain

The incidence of 'Ca. P. mali' was surveyed in apple production areas in four northern regions of Spain (Asturias, the Basque Country, Navarre and Catalonia) in 2010. The plots in apple orchards in the studied areas represented the main agro-ecological conditions under which apple is mainly grown commercially in Spain: the extensive non-irrigated cider apple orchards of the Atlantic regions with oceanic climate (Asturias, Basque Country and Navarre), and the intensive irrigated dessert apple orchards of Catalonia and the Ebro valley with a Mediterranean and continental-Mediterranean climate. The plots were chosen in collaboration with the regional phytopathological services. In the Atlantic regions, the phytopathological services indicated highly AP affected orchards with the main varieties and cultivation conditions in every region. These cider apple orchards are small, non-irrigated, with mixed varieties to improve pollination, and cultivated in an extensive manner. This includes

low insecticide treatments and fertilization, and no fruit thinning. In the Atlantic regions, the orchards are near natural environments including woods and pastures where wild and naturalized apple trees and *C. monogyna* bushes are common. In Catalonia, three different agro-ecological apple production areas were surveyed: the Lleida area, in the central Ebro valley with a continental-Mediterranean climate; the Girona area, with a humid-Mediterranean climate between the sea and the Pyrenees; and the Barcelona coastal area, with a fully Mediterranean climate. In Catalonia, the dessert apple orchards are planted with the main international varieties and cultivated intensively, with irrigation, insecticide treatments, fertilization and spaliers. No wild apple trees are present in the Mediterranean areas, but *C. monogyna* is common in cool locations even near the rivers in continental areas such as Lleida. In Catalonia, despite no specific AP symptoms being observed, orchards with yellowing or symptoms similar to phytoplasmas were chosen by the phytopathological services. Incidence of 'Ca. P. mali' was evaluated by visual inspection in 49 apple plots: ten dessert apple plots with no clear AP symptoms in Catalonia and 39 affected cider apple plots in Asturias, the Basque Country and Navarre. In the dessert apple orchards of Catalonia, the plots had 200 apple trees per orchard in a large central block to reduce the border effect. In the cider apple orchards of Asturias and the Basque Country, due to the tradition of mixing different varieties in small orchards, plots included 50 trees of every variety in central blocks, and in Navarre the plots had 100 trees. Visual inspection and plant sampling were carried out in September, when conditions for observing symptoms and detecting phytoplasmas are optimal. In Catalonia, ten apple trees with nonspecific symptoms, including low vigor, chlorosis and reddening, were collected randomly. In the Atlantic regions, trees were inspected for clear symptoms including proliferation of side shoots, witches' brooms and enlarged stipules. In Asturias, the Basque Country and Navarre, five symptomatic apple trees per plot were analysed to confirm infection by 'Ca. P. mali'; when there were no or insufficient symptomatic trees, asymptomatic trees were collected randomly to give five trees sampled. The shoot samples, due to the irregular distribution, were taken from four different branches of each apple tree to ensure phytoplasma detection. Plant material was stored at 4°C prior to DNA extraction and analysis.

'Ca. P. mali' potential insect vectors collected from the apple orchards in Spain

Cacopsylla spp. populations were surveyed in the orchards of the regions of Catalonia, Asturias and the Basque Country in 2010 and 2011. In Asturias and the Basque Country, two 'Ca. P. mali' symptomatic cider apple orchards with evidence of active spreading were studied in each region. In Catalonia, seven asymptomatic dessert apple orchards were studied, cultivated under three agro-ecological conditions, representing the main apple production areas in the region to evaluate potential vectors and the risk of dissemination, despite no clear AP symptoms being observed. The insects were captured with four yellow sticky traps per plot (Projar ©) (10 x 16 cm) x 2 sides = 0.032 m². The traps were placed at a height of 1.75 m in the apple trees in the corners of the orchards, and replaced every 15 days from March to July. The *Cacopsylla* spp. individuals were removed and classified following (Hodkinson and White 1979; Ossianilsson 1992). The insects were stored in eppendorf tubes at -20°C and analysed individually.

'Ca. P. mali' detection in plants and insects

The samples of apple trees and potential insect vector samples were analysed by PCR to detect 'Ca. P. mali'. Total DNA from plants was obtained by mixing 1 g of fresh leaf midribs and phloem tissue from stems together, using the phytoplasma-enrichment procedure of Ahrens and Seemüller (1992). Total DNA from insects was obtained following the procedures of Batlle et al., 2008 and Garcia-Chapa et al., 2005. The DNA extracts obtained were stored at -20°C. The universal primers for phytoplasma detection, P1/P7 (Deng and Hiruki 1991; Smart et al. 1996), located at the 16S rDNA and 23S rDNA gene, respectively, were used in the first step to amplify a fragment of about 1800 base pairs (bp). In the second step, the universal primers R16F2n/R16R2n and f01/r01 specific primers to the AP group were used, with a length of 1200bp and 1051 bp respectively (Lorenz et al. 1995). The first amplification, using 5–10 ng of DNA, was in a total volume of 20 µl containing the following: 0.250 µM of each universal primer, 250 µM dNTPs, 1 unit 100 µl⁻¹ Taq DNA polymerase (Promega®) and 1 x Taq buffer. Two microliters of 1:50 dilution of the first amplification product were used for the second step. The second amplification mixture contained the same components, but primers concentration was 0.375 µM. Products were analyzed by

electrophoresis in a 1.5% D-1 agarose gel (Pronadisa©) according to standard procedures. DNA was stained with ethidium bromide and exposed to ultraviolet light. Healthy apple trees and *Catharanthus roseus* seedlings were used as negative controls in PCR assays. To ensure 'Ca. P. mali' detection, RFLP analysis of fO1/rO1 primer pair amplification products were performed with *RsaI* and *SspI* restriction enzymes following (Lorenz et al. 1995; Garcia-Chapa et al. 2003).

RESULTS

Incidence and distribution of 'Ca. P. mali' in northern Spain apple orchards

The surveys showed that 'Ca. P. mali' is widespread in the cider apple orchards of northern Spain in regions with oceanic climate (Basque Country, Asturias, and Navarre). 'Ca. P. mali' was detected by PCR with a high concordance in the symptomatic trees (Table 1). No phytoplasma was detected with R16F2n/R16R2n that was not detected with f01/r01. 'Ca. P. mali' was also detected on asymptomatic trees in the Aduna, Aizarnazabal and Donestebe plots (Table 1). In Asturias and the Basque Country, the high incidence and dissemination of 'Ca. P. mali' causes major damage and economic losses. In Catalonia, there were no clear symptoms in the ten apple orchards surveyed and 'Ca. P. mali' was not detected on any tree. Visual incidence of 'Ca. P. mali' ranged from 0% to 92% in the Basque Country, from 0% to 6% in Navarre and from 14% to 40% in Asturias. The local varieties Gezamina, Txalaka, and Verde Agria were more affected, showing clearer symptoms than the other local varieties of Urtebi Haundi, Urtebi Txiki, Mozolua and Goikoetxe, although these results were very irregular, with some varieties being highly affected in one plot and practically without symptoms in another (Table 1). There was a high incidence in the variety Verde Agria, of 92% in Aduna and 64% in the Aizarnazabal plot. For the variety Mozolua, the visual incidence was 0% in the plots of Aduna, Aizarnazabal and Donestebe, and 80% and 32% in the plots of Aia and Usurbil, respectively (Table 1). There was also a major difference between the visual incidence of the two varieties in the plots of Aia and Alkiza. 'Ca. P. mali' detection in the asymptomatic plots showed that the Mozolua and Goikoetxe varieties had high infection rates, with four of every five asymptomatic trees

analysed in every plot being positive. In contrast, the infection rates were lower for asymptomatic plots of the varieties Urtebi Txiki and Urtebi Haundi, with one in every five trees analysed being positive. In Asturias, the highest visual incidence recorded (40%) was in the variety Regona in the Siero plot and the lowest in the variety Raxao (14%) in the Regueras plot. The main dessert apple varieties surveyed in Catalonia (Fuji, Golden Delicious, Royal Gala) did not show any clear AP symptom in the 2000 trees surveyed in the ten plots and no phytoplasmas were detected in the 100 asymptomatic trees randomly analysed in the three agro-ecological conditions studied (Table 1).

Collection and 'Ca. P. mali' infection rate of *Cacopsylla picta* and *Cacopsylla melanoneura* in northern Spain apple orchards

Several species of *Cacopsylla* spp. were caught in the sampled plots, among them the two reported vectors of 'Ca. P. mali', *C. picta* and *C. melanoneura*. *C. picta* was caught in the two Basque Country plots in the two years of study. The highest captures of *C. picta* were about 20 individuals in the Aia plot, in the peaks of both years (Figs. 1 and 2). In Asturias, a few *C. picta* individuals were caught in 2011 in the two plots, but none in 2010 (Figs. 1 and 3). *C. melanoneura* was captured in the three sampled regions, at least in one plot. In the Basque Country, *C. melanoneura* was caught only in one plot and year (Aduna, 2011), with a peak of 32 individuals in April. In Asturias, the *C. melanoneura* populations were more stable and present in the two sampled plots in both years. The highest capture data were recorded in 2011, with peaks of seven and ten individuals in April in the Regueras and Siero plots, respectively (Fig. 3). In Catalonia, no *C. picta* individuals were caught and only three individuals of *C. melanoneura* were present in the Olesa plot on one date and year. In this region, other *Cacopsylla* species, such as *C. pyri*, *C. pruni*, *C. pulchella* and *C. crataegui*, were captured in the apple orchards, depending on the surrounding crops, gardens and natural vegetation. There were two peaks of *C. picta* captures, the first in April and the second in June. These peaks corresponded to dark-green remigrant individuals in April and light green emigrant individuals in June. The *C. melanoneura* dynamics showed only one clear peak in April, although a few individuals were captured in June in the Asturias plots. 'Ca. P. mali' was detected on *C. picta* in all the plots where the vector was caught in

Asturias and the Basque Country. *C. melanoneura* was positive to 'Ca. P. mali' in the plots of Asturias, while the individuals captured in the Basque Country and Catalonia were negative (Table 2). There were no major differences in the infection rates between years. The *C. picta* remigrant individuals captured in the Basque Country showed an average infection rate of 20%, while 14% of emigrant individuals were positive. In Asturias, *C. picta* remigrant individuals showed an infection rate of 25%, while the emigrant infection rate was 33%. The *C. melanoneura* infection rate in Asturias was 8% in the remigrants and 25% for emigrants. In most of the plots these percentages are not very representative due to the low capture levels and the consequent low number of analysed insects.

DISCUSSION

This study presents the first extensive data report on the incidence, potential vectors and geographic distribution of 'Ca. P. mali' in Spain. The data obtained demonstrate that 'Ca. P. mali' is widespread in the apple orchards of the Atlantic regions of Asturias, the Basque Country and Navarre. In the cider apple orchards of the Basque Country, the incidence was up to 50% in some plots and varieties. Incidence in most of the orchards in Asturias and the Basque Country was between 10 and 30%. These results imply that, in the Spanish regions with oceanic climate, apple production is endangered by 'Ca. P. mali' as in other European countries with similar agro-ecological conditions (Baric et al. 2010; Jarausch et al. 2011). In Navarre, the incidence was lower than in the other Atlantic regions, but it should be taken into consideration that the studied plots were younger (four years) than other plots and the time for infection and development of symptoms was shorter. No symptoms or 'Ca. P. mali' were found in the ten apple orchards in the three different agro-ecological areas studied in Catalonia. These results confirmed that the dessert apple orchards of the Mediterranean and continental-Mediterranean climate regions are currently 'Ca. P. mali' free. The producers of the Atlantic areas indicated that the high incidence of 'Ca. P. mali' caused major losses in total harvest and low levels of sugar concentration, which meant uprooting of the orchards. This situation is seriously compromising the economic viability of the crop and could force local cider producers to import apples from other regions and countries

to maintain the local markets. The incidence was highly variable between the different varieties in the same plot. In a single orchard, varieties are expected to have similar incidence due to similar infection pressure, unless differences in the degree of tolerance of the varieties is the key factor. This irregularity is especially important in plots such as Aduna or Aizarnazabal, in the Basque Country, where visual incidence in the variety Mozolua was 0% compared to more than 60 % in the variety Verde Agria. The variety Verde Agria was severely affected in all plots, but Mozolua was affected only in some locations. These differences could be due to the varietal degree of tolerance, and this is the case for the variety Mozolua in the Aduna and Aizarnazabal plots, where the infection rate was four out of five asymptomatic trees analysed. However, in the Aia plot this variety had a visual incidence of 80%, so this cannot be considered a tolerant variety. This irregularity could be explained by the propagation of different lineages of traditional varieties not genetically homogeneous, with variable degrees of tolerance between them. The age of the trees cannot be considered a factor to explain the different incidence between varieties in the same orchard, as this was the same for all varieties. On the other hand, the varieties Urtebi Haundi and Urtebi Txiki had no symptoms and low infection rates (1+/5). These results could be explained by a low level of attraction of the vectors for these varieties. These data show the need for a program to obtain homogeneous and phytoplasma-free plant material for the traditional cider apple cultivars. It will also be interesting to test the tolerance of the local cider varieties and lineages of 'Ca. P. mali' to obtain tolerant plant material.

The high incidences in the Basque Country and Asturias correlate with the presence of populations of the two 'Ca. P. mali' known vectors, *C. picta* and *C. melanoneura*. Both insect vector species captured were carriers of 'Ca. P. mali'. On the other hand, in the seven non-affected plots sampled for potential vectors in Catalonia no *C. picta* and only three negative individuals of *C. melanoneura* were captured. These results reveal a clear relationship between the incidence of 'Ca. P. mali' and the presence of infected known vector species in a particular area. The dynamics followed by *C. picta* in Spanish apple orchards were similar to that observed in Germany and Italy (Jarausch et al. 2011; Mattedi et al. 2008). The captures followed a double peak in April and June, corresponding to the remigrant and emigrant individuals respectively, but in the plots

with few captures these dynamics are not clear. The total number of captures was insufficient to reach a consistent conclusion on population dynamics.

The *C. picta* infection rate obtained in the Basque Country was 19% for remigrants and 17% for emigrants in the Aia plot and 27% and 0% in Aduna plot. The results of the Aduna plot were less representative due to the low number of insects captured. In Asturias, with very few *C. picta* captured, the infection rate for the two plots were 2+/7 and 2+/6 in the Siero and Regueras plots respectively. The total average of infected *C. picta* in Germany, Eastern France and Switzerland is lower, at 10.6 % (Jarausch et al. 2011) and in Trentino (north-east Italy) 11.1% (Baric et al. 2010). For comparisons with other studies, it is important to take into consideration that our infection rate data were obtained by nested-PCR, while other data are obtained by single-PCR. In the Basque Country, none of the 32 *C. melanoneura* captured in the same plot and on the same date tested positive. These results suggest that the population of *C. melanoneura* could have more affinity to apple trees in Asturias than to the population in the Basque country, being their populations more regularly present in the apple orchards and AP infected. However, our data does not enable us to fully understand the role of every psyllid species in the studied areas, or to attribute the major responsibility for infection to a specific species, in every region. More plots, in different areas, and transmission trials are needed to elucidate its role as a vector of every species in both regions. The fact that in the Basque Country, the region with the higher incidence, the captures of *C. melanoneura* were restricted to a single plot and date, with an infection rate of zero, could indicate that *C. picta* has the major role in this region. On the other hand, *C. melanoneura* and *Crataegus monogyna* are common in Catalonia, where 'Ca. P. mali' infections are very rare and related to imported plant material. We cannot discard the existence of another host-race of *C. melanoneura* in the regions (Malagnini et al. 2013). Other species of *Cacopsylla* spp. carrying phytoplasmas of the AP group were found in apple orchards in Catalonia associated to the plants in the neighboring areas. These species were mainly *C. pruni* and *C. pulchella* in Baix Llobregat and *C. pyri* in Lleida. These crossed-hosts *Cacopsylla* spp. captures confirmed that these adult psyllids are interested in plants other than the primary hosts. These cross-host events could allow the phytoplasmas to jump to a new plant host species and result in the appearance of new diseases or phytoplasma recombination (Danet et al. 2011; Sabaté et al. 2014). The

results obtained in this study clarify the incidence of 'Ca. P. mali' and its vector distribution in Spain. Mediterranean dessert apple production is not endangered due to the lack of the pathogen and the known vectors. Incidence in the Atlantic regions is very high where the two known vectors were caught in the apple orchards, but the role of each vector species and their hosts and cycle need to be studied in more depth. Results suggest that the Cantabrian Mountains and the Pyrenees are the southern limit of 'Ca. P. mali', as there are no AP reports in other Mediterranean, central or southern regions of Spain. This distribution is probably related to that of the insect vectors and wild host plants. It is also important to have healthy plant material of the traditional varieties, and clarify the interaction between orchard management and the spread of 'Ca. P. mali'. Other objectives for the future are to establish the role of the vector species in each area and the presence of wild hosts for the vector and the phytoplasma. In Catalonia and the non-Atlantic regions, despite the limited presence of *C. melanoneura* in the apple orchards, plant health authorities recommend nurseries remain alert for the introduction and multiplication of infected plant material.

REFERENCES

- 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.
- Baric, S., Öttl, S., & Dalla via, J. (2010). Infection rates of natural psyllid populations with 'Candidatus Phytoplasma mali' in South Tyrol (Northern Italy). *Julius-Kühn-Archiv*: 427.
- Batlle, A., Altabella, N., Sabaté, J., & Laviña, A. (2008). Study of the transmission of Stolbur Phytoplasma to different crop species, by *Macrostelus quadripunctulatus* (Kirschbaum). *Annals of Applied Biology* 152: 235-242.
- Canik, D., & Ertunc, F. 2007. Distribution and molecular characterization of Apple Proliferation phytoplasma in Turkey. *Bulletin of insectology* 60(2): 335-336.
- Ciccotti, A.M., Bianchedi, P.L., Bragagna, P., Deromedi, M., Filippi, M., Forno, F., & Mattedi, L. (2007). Transmission of 'Candidatus phytoplasma mali' by root bridges under natural and experimental conditions. *Bull. Insectol.* 60: 387-388.

- Danet, J.L., Balakishiyeva, G., Cimerman, A., Sauvion, N., Marie-Jeanne, V., Labonne, G., Laviña, A., Batlle, A., Krizanac, I., Skoric, D., Ermacora, P., Serçe, C.U., Çaglayan, K., Jarausch, W., & Foissac, X. (2011). Multilocus sequence analysis reveals the genetic diversity of European fruit tree phytoplasmas and supports the existence of inter-species recombination. 2011. *Microbiology* 157: 438- 450.
- Deng, S., & Hiruki, C. (1991). Amplification of 16S rRNA genes from culturable and non-culturable mollicutes. *J Microbiol Meth.*, 14: 53–61.
- Frasinghelli, C., Delaiti, L., Grando, M.S., Forti, D., & Vindimian, M.E. (2000). *Cacopsylla costalis* (Flor 1861), as a vector of apple proliferation in Trentino. *Journal of Phytopathology* 148: 425-431.
- Garcia-Chapa, M., Medina, V., Viruel, M.A., Laviña, A., & Batlle, A. (2003). Seasonal detection of Pear decline Phytoplasma by nested-PCR in different pear cultivars. *Plant Pathology* 52: 513-520.
- Garcia-Chapa, M., Sabaté, J., Laviña, A., & Batlle, A. (2005). Acquisition and transmission of Pear decline phytoplasma in Spain. Role of *Cacopsylla pyri*. *European Journal of Plant Pathology* 111: 9-17.
- Hodkinson, I.D., & White, I.M. (1979). Homoptera. Psylloidea. Ed. Royal Entomological Society of London.
- Jarausch, B., Schwind, N., Jarausch, W., Krczal, G., Dickler, E., & Seemüller, E. (2003). First report of *Cacopsylla picta* as a vector of apple proliferation phytoplasma in Germany. *Plant disease* 87: 101
- Jarausch, B., Schwind, N., Fuchs, A., & Jarausch, W. (2011). Characteristics of the spread of apple proliferation by its vector *Cacopsylla picta*. *Phytopathology* 101: 1471-1480.
- Kube, M., Schneider, B., Kuhl, H., Dandekar, T., Heitmann, K., Migdoll, A.M., Reinhardt, R., & Seemüller, E. (2008). The linear chromosome of the plant pathogenic mycoplasma 'Candidatus Phytoplasma mali'. *BMC Genomics* 9: 306.
- 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: 771-776.

- Malagnini, V., Pedrazzoli, F., Papetti, C., Cainelli, C., Zasso, R., Gualandri, V., Pozzebon, A., & Ioriatti, C. (2013). Ecological and genetic differences between *Cacopsylla melanoneura* (Hemiptera, Psyllidae) populations reveal species host plant preference. DOI: 10.1371/journal. Pone. 0069663.
- Mattedi, L., Forno, F., Cainelli, C., Grando, M.S., & Jarausch, W. (2008). Research on 'Candidatus Phytoplasma mali' transmission by insect vectors in Trentino. *Acta Horticulturae* 781: 369-374.
- Mayer, C.J., Jarausch, B., Jarausch, W., Jelkmann, W., Vilcinskas, A., & Gross, J. (2009). *Cacopsylla melanoneura* has no relevance as vector of Apple Proliferation in Germany. *Phytopathology* 99 (6):729-738.
- Mayer, C.J., Vilcinskas, A., & Gross, J. (2010). Chemically mediated multitrophic interactions in a plant-insect vector-phytoplasma system compared with a partially non-vector species. *Agric. For. Entmol.* Online publication. Doi: 10.1111/j:1461-9563.
- Ossianilson, F. (1992). The psylloidea (Homoptera) of Fenoskandia and Denmark. Vol.26, *Fauna Entomologica Scandinavica*. Ed. Brill.
- Pizzinat, A., Tedeschi, R., & Alma, A. (2011). *Cacopsylla melanoneura* (Foerster): aestivation and overwintering habitats in Northwest Italy. *Bulletin of Insectology* 64: 135-136.
- Rui, D., Ciferri, R., & Refatti, E. (1950). La virosi degli 'scopazzi del melo' nel Veronese. *Notiziario sulle malattie delle piante*. 13: 7-11.
- Sabaté, J., Laviña, A., & Batlle, A. (2014). First report of 'Candidatus Phytoplasma pyri' causing Peach yellow leaf roll (PYLR) in Spain. *Plant Disease* Vol. 98(7): 989
- Seemüller, E., & Schneider, B. (2004). 'Candidatus Phytoplasma mali', 'Candidatus Phytoplasma pyri' and 'Candidatus Phytoplasma prunorum', the causal agents of apple proliferation, pear decline and European stone fruit yellows, respectively. *Int. J. Syst. Evol. Microbiology*. 54(4): 1217-1226.
- Seemüller, E., & Schneider, B. (2007). Differences in virulence and genomic features of strains of 'Candidatus Phytoplasma mali', the apple proliferation agent. *Phytopathology* 97: 964-970.

- Smart, C. D., Schneider, B., Blomquist, C. L., Guerra, L.J., Harrison, N. A., Ahrens, U., Lorenz, K. H., Seemüller, E., & Kirckpatrick, B. C. (1996). Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of the 16S-23S rRNA spacer region. *Applied Environmental Microbiology*, 62: 1988-1993.
- Tedeschi, R., Bosco, D., & Alma, A. (2002). Population dynamics of *Cacopsylla melanoneura* (Homoptera:Psyllidae), a vector of apple proliferation phytoplasma in northwestern Italy. *Journal of Economic Entomology* 95: 544-551.
- Tedeschi, R., & Alma, A. (2004). Transmission of Apple Proliferation phytoplasma by *Cacopsylla melanoneura* (Homoptera: psyllidae). *Journal of economic entomology* 97: 8-13.
- Tedeschi, R., Baldesari, M., Mazzoni, V., Trona, F., & Angeli, G. (2012). Population dynamics of *Cacopsylla melanoneura* (Hemiptera: Psyllidae) in northeast Italy and its role on Apple proliferation epidemiology in apple orchards. *J. Econ. Entomol.* 105(2): 322-8.

Table 1. Visual incidence and RO1/FO1 PCR detection of 'Ca. P mali' in aple orchards of Asturias, Basque Country, Navarre and Catalonia in 2010.

Region Plot	Age	Variety	Visual incidence %	Detection
Basque Country				
Aduna1	18	Mozolua	0%	4+/5
Aduna2	18	Verde Agria	92%	5+/5
Aduna3	18	Urtebi Txiki	0%	3+/5
Aia1	13	Errezila	40%	5+/5
Aia2	9	Mozolua	80%	5+/5
Aia3	9	Moko	42%	5+/5
Aia4	9	Gezamina	16%	5+/5
Aizarnazabal1	22	Txalaka	10%	5+/5
Aizarnazabal2	22	Urtebi Txiki	0%	1+/5

Aizarnazabal3	22	Verde Agria	64%	5+/5
Aizarnazabal4	22	Mozolua	0%	4+/5
Aizarnazabal5	22	Errezila	34%	5+/5
Aizarnazabal6	22	Goikoetxe	0%	4+/5
Aizarnazabal7	22	Moko	14%	5+/5
Aizarnazabal8	22	Urtebi Haundi	0%	1+/5
Alkiza1	10	Gezamina	10%	5+/5
Alkiza2	10	Goicoetxe	14%	5+/5
Alkiza3	10	Txalaka	50%	5+/5
Alkiza4	10	Urtebi Haundi	8%	4+/5
Usurbil1	12	Mozolua	32%	5+/5
Usurbil2	12	Moko	30%	5+/5
Usurbil3	12	Txalaka	54%	5+/5
Usurbil4	12	Goikoetxe	32%	5+/5
Navarre				
Donestebe1	4	Urtebi Txiki	0%	0+/5
Donestebe2	4	Moko	4%	5+/5!
Donestebe3	4	Urtebi Haundi	4%	4+/5
Donestebe4	4	Goikoetxe	6%	5+/5
Donestebe5	4	Txalaka	6%	5+/5
Donestebe6	4	Mozolua	0%	1+/5
Asturias				
Siero1	15	Blanquina	18%	5+/5
Siero2	15	Verdialona	34%	5+/5
Siero3	15	Regona	40%	5+/5
Siero4	15	Coloradona	24%	5+/5
Regueras1	11	Raxao	14%	4+/5

Regueras2	11	Perico	28%	5+/5
Regueras3	9	Limón	22%	5+/5
Regueras4	9	Regona	18%	5+/5
Catalonia				
Begues(B)	14	Golden Delicious	0%	0+/10
Olesa(B)	6	Fuji	0%	0+/10
St. Vicenç(B)	9	Royal Gala	0%	0+/10
Sta. Coloma(B)	16	Fuji	0%	0+/10
Mas Badia(G)	14	Golden Delicious	0%	0+/10
Ullà(G)	8	Early Red One	0%	0+/10
Borges B.1(L)	17	Fuji	0%	0+/10
Borges B.2(L)	23	Golden Delicious	0%	0+/10
Mollerussa(L)	12	Fuji	0%	0+/10
Gimenells(L)	18	Golden Delicious	0%	0+/10

Plot size: Asturias and Basque Country 50 trees; Navarre 100 trees; Catalonia 200 trees. Catalonia provinces: B (Barcelona); G (Girona); L (Lleida)

Table 2. Different *Cacopsylla* spp. captured in apple orchards of Asturias, Basque Country and Catalonia in 2010 and 2011 and its infection rate. (R)Remigrant, (E) Emigrant. Incidence: visual incidence of the orchard.

Plot (Region)	+ <i>C. picta</i> (R)	+ <i>C. picta</i> (E)	+ <i>C. mel.</i> (R)	+ <i>C. mel.</i> (E)	<i>Cacopsylla</i> spp	Incidence
Basque Country						
Aduna	3+/11 (27%)	0+/9 (0%)	0+/32 (0%)	0	-	46%
Aia	12+/64 (19%)	10+/58 (17%)	0	0	-	44.5%
Asturias						
Siero	1+/3 (33%)	1+/4 (25%)	1+/9 (11%)	1+/3 (33%)	-	29%
Regueras	0+/1 (0%)	2+/5 (40%)	1+/14 (7%)	0+/1(0%)	-	20.5%
Catalonia						
Begues	0	0	0	0	<i>C. pruni/C. pul.</i>	0%
Olesa	0	0	0	0+/3 (0%)	<i>C. pruni/C. pul</i>	0%
St.Vicenç	0	0	0	0	<i>C. pruni/C. pul.</i>	0%
Mas Badia	0	0	0	0	<i>C. pyri</i>	0%
Ullà	0	0	0	0	<i>C. pyri/C.cra.</i>	0%
Borges B.	0	0	0	0	<i>C. pyri</i>	0%
Mollerussa	0	0	0	0	<i>C. pyri</i>	0%

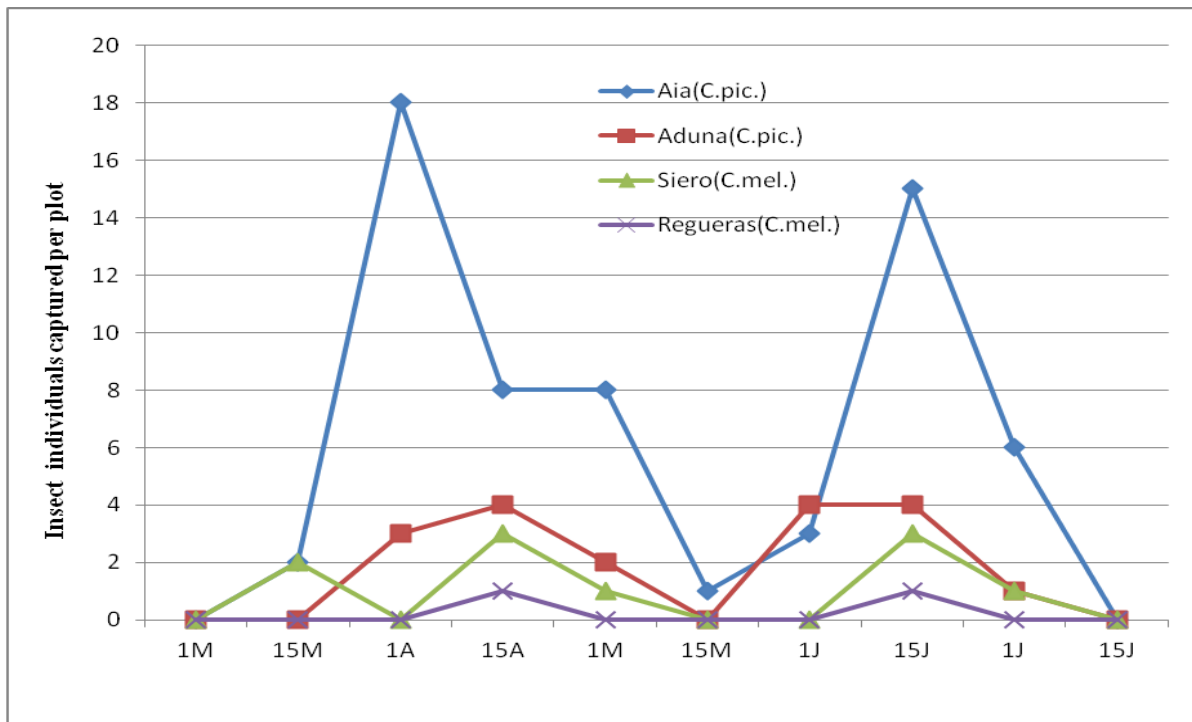


Figure 1. Individuals of *C. picta* and *C. melanoneura* captured in Basque Country and Asturias apple orchards in 2010.

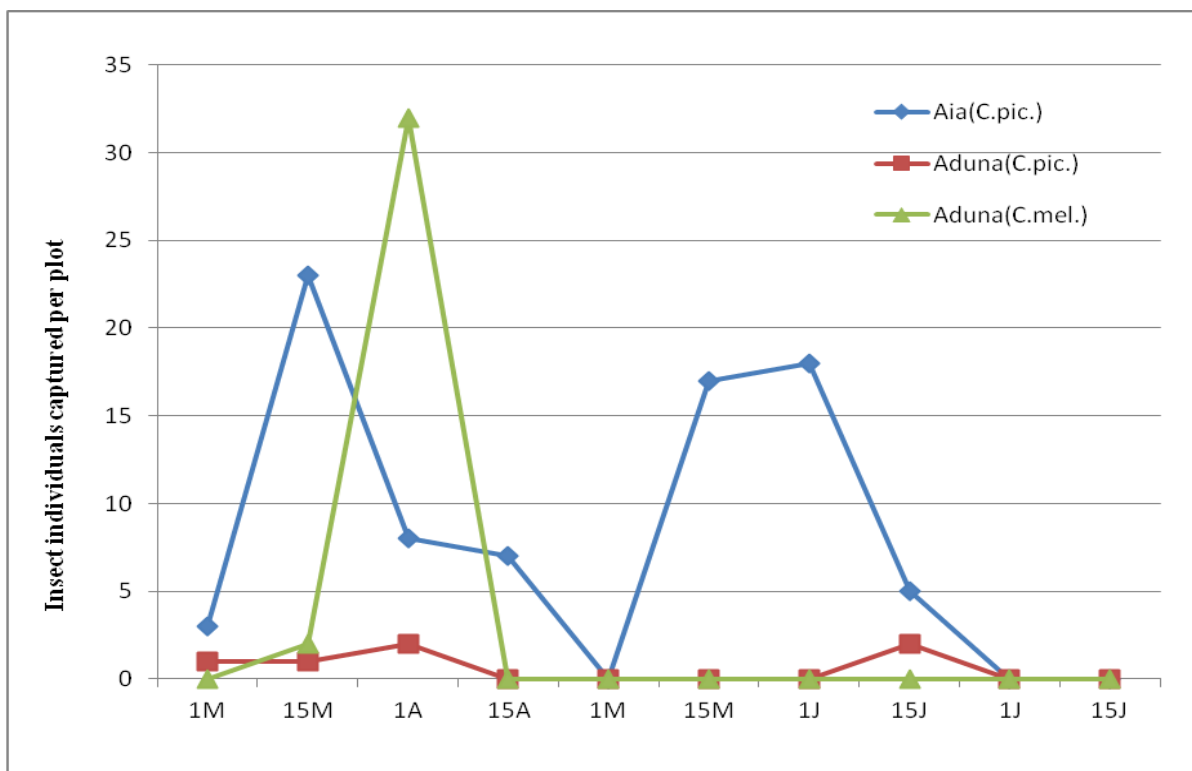


Figure 2. Individuals of *C. picta* and *C. melanoneura* captured in Basque Country apple orchards in 2011.

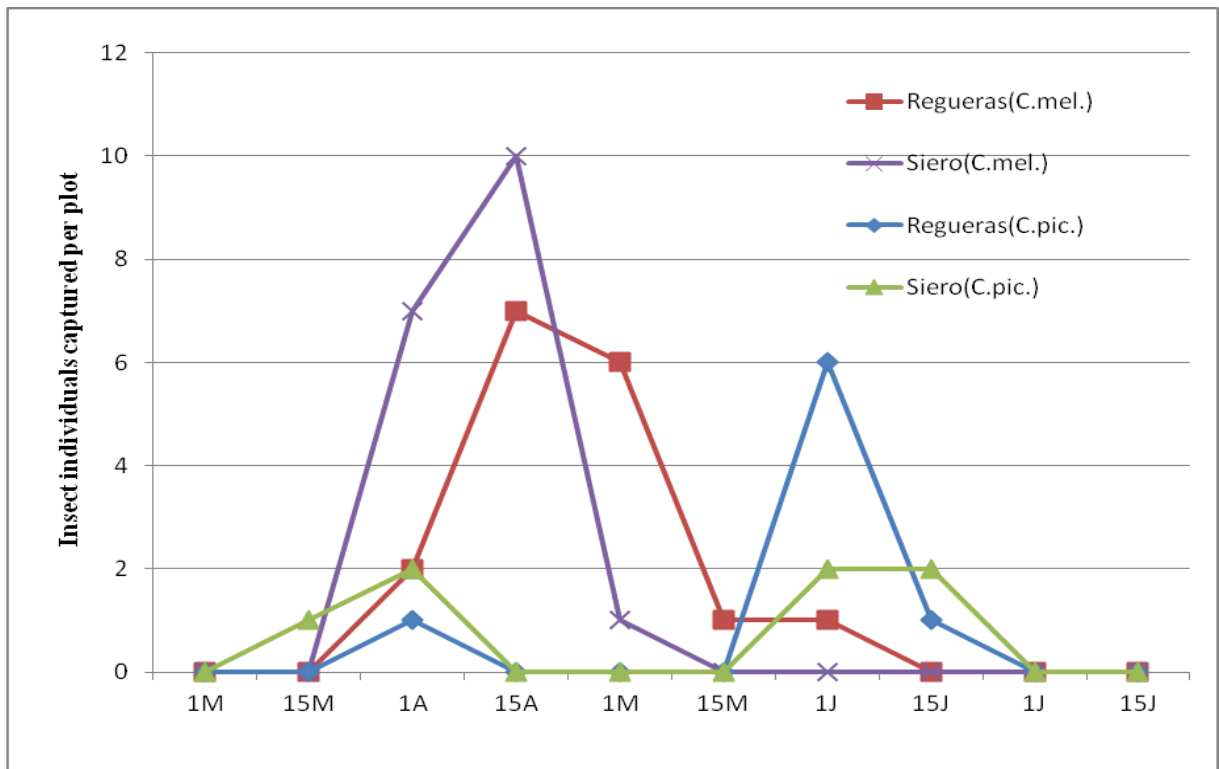


Figure 3. Individuals of *C. picta* and *C. melanoneura* captured in Asturias apple orchards in 2011.

Capítol 3: Estudi i identificació de 'Candidatus Phytoplasma pyri' causant del PYLR en presseguer

Títol: Primera referència de 'Candidatus Phytoplasma pyri' causant PYLR o Enrotllament de fulla cloròtica del presseguer a Espanya

Article resumit

L'agent causal dels ESFY (Esgroguèiments europeus dels fruiters de pinyol) és 'Candidatus Phytoplasma prunorum', essent el fitoplasma prevalent a Europa infectant els fruiters de pinyol (*Prunus spp.*). Aquest fitoplasma és molt proper genèticament a 'Ca. P. pyri', que causa el Decaïment del perer (PD) en perers i codonyers principalment. Tots dos fitoplasmes pertanyen al grup ribosòmic de fitoplasmes 16SrX i són transmesos de manera natural per diferents espècies d'insectes vectors pertanyents al gènere *Cacopsylla*. A Nord-Amèrica s'ha demostrat que 'Ca. P. pyri' pot infectar els perers i els presseguers, causant les malalties del PD i del PYLR respectivament. A Europa, fins ara no s'havia descrit cap brot de 'Ca. P. pyri' infectant presseguers, malgrat que aquest fitoplasma és present arreu on es conrea el perer. Als Estats Units l'insecte vector del PYLR als presseguers és el mateix que transmet el PD als perers, *C. pyricola*. L'any 2012 es va observar en presseguers a Lleida una simptomatologia desconeguda típicament fitoplasmàtica, que consistia en envermelliments prematurs de fulles, enrotllat, decaïment, fruits deformats i petits, manca de vigor i mort. Els símptomes eren significativament diferents als típics d'ESFY, ja que els esgroguèiments i desordres fenològics en aquest cas, no eren presents i la simptomatologia majoritària eren envermelliments, enrotllat i decaïment. Així mateix, aquest símptomes afectaven per igual a un ampli ventall de varietats i patrons, suggerint transmissió per insectes. En aquesta zona no ha estat identificat fins ara el vector dels ESFY, *C. pruni*, i la malaltia no són habituals. Pel contrari, 'Ca. P. pyri' i el seu vector *C. pyri* són molt abundants a la zona, on constitueixen una malaltia endèmica i una gran plaga per al conreu del perer. Per tal de determinar l'agent causal de la simptomatologia observada a Lleida en presseguer, és van prendre mostres de rams de 20 arbres simptomàtics diferents de 7 parcel·les en un radi d'uns dos quilòmetres quadrats. La incidència a la parcel·la més

afectada arribava fins al 40%, podent-se observar que en els marges era més elevada. Es va extreure ADN de fitoplasmes i es va amplificar amb els iniciadors universals ribosòmics per a fitoplasmes P1/P7 i R16f2N/R16r2N, i amb els iniciadors específics per al grup 16SrX, fO1/rO1. Per a determinar el fitoplasma concret del grup X es van digerir els amplificats obtinguts amb els enzims de restricció *RsaI* i *SspI*. D'altra banda es van realitzar amplificacions amb els iniciadors no ribosòmics ImpESFY, ImpPD-A i ImpPD-B, iniciadors situats al gen *Imp* que codifiquen per proteïnes de membrana, i per tant són molt variables. Es van usar com a controls mostres infectades d'ESFY, de PD i presseguers sans de llavor. Els amplificats d'ADN de fitoplasmes, van ser seqüenciats i comparats amb les seqüències dipositades al Genbank. Es van detectar fitoplasmes a 18 de les 20 mostres preses. Totes les mostres positives a ImpPD ho van ser per A i per B a la vegada i no per a ImpESFY. Les seqüències obtingudes amb R16f2N/R16r2N van mostrar una homologia del 100% amb la soca PD1 de referència de '*Ca. P. pyri*', la més abundant a Europa. Amb els iniciadors ImpPD que amplifiquen regions més variables, es va obtenir una homologia del 99,55 amb la soca PD33Lib del Líban. En conclusió, s'ha determinat que l'aïllat de '*Ca. P. pyri*' causant PYLR en els presseguers de Lleida, és molt més proper als aïllats de PD europeus o d'Orient Mitjà, que no pas als aïllats que causen la malaltia a Amèrica. Aquesta es la primera vegada que es detecta '*Ca. P. pyri*' en presseguer a Espanya, i la primera vegada a Europa, causant brots d'importància econòmica en aquest conreu.

**First report of 'Candidatus Phytoplasma pyri' causing
Peach yellow leaf roll (PYLR) in Spain.**

J. Sabaté, A. Laviña and A. Batlle

*IRTA, Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries, Ctra Cabrils km 2, 08348
Cabrils, Barcelona, Spain*

Plant Disease 98(7) : 989. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-10-13-1105-PDN>

Report

'Candidatus Phytoplasma prunorum' that causes European stone fruit yellows (ESFY), is the prevalent phytoplasma affecting *Prunus spp.* in Europe. It is closely related to 'Ca. P. pyri', that causes Pear decline (PD) in pear trees. Both phytoplasma belong to the ribosomal group 16Sr-X and are naturally transmitted by different species of *Cacopsylla spp.* (Seemüller & Schneider, 2004). In North America, 'Ca. P. pyri' is responsible for Peach yellow leaf roll (PYLR), transmitted by *C. pyricola* from pear to peach trees (Purcell *et al.*, 1981; Blomquist & Kirkpatrick, 2002). In Spain, 'Ca. P. prunorum' is widespread on *Prunus spp.*, but its occurrence on *P. persica* is very low and 'Ca. P. pyri' is present in every pear orchard (Garcia-Chapa *et al.*, 2003; Sabaté *et al.*, 2007).

During 2012, a previously unreported syndrome (Cieslinska, 2011) including early reddening, leaf curling, decline, abnormal fruits, and in some cases chlorosis and death of peach trees was reported in peach in Lleida, Northern Spain. Symptoms were different to ESFY and PYLR, in that flowering disorders such as ESFY or yellows were not apparent, and reddening and decline were the most common symptoms.

The disease was present in a wide range of varieties and rootstocks, suggesting insect transmission in an area where *C. pruni*, vector of *Ca. P. prunorum*, was not previously reported, but *C. pyri* was abundant in pear orchards. Shoot samples from 20 symptomatic peach trees were collected in seven orchards within a 2 km² area with an estimated incidence of 40%, which was higher in the borders.

DNA was extracted from 1 g of leaf mid-ribs and phloem tissue and amplified with ribosomal universal primers P1/P7 followed by nested PCR with R16F2n/R16R2 and specific primers fO1/rO1 that target the 16Sr-X group (Garcia-Chapa *et al.*, 2003). The final PCR products were digested with *RsaI* enzyme. Amplifications with non-ribosomal specific primers, Imp ESFY, Imp PD-A and Imp PD-B that amplify sequences of gene *Imp*, that encode a phytoplasma membrane protein, were also carried out (Danet *et al.*, 2011). Tissue samples with ESFY and PD, and peach seedlings were used as positive and negative controls, respectively. Amplified PCR products were sequenced and compared to sequences deposited in the Genebank.

Phytoplasmas were detected in 18 of the 20 samples analysed. No phytoplasmas were detected in negative peach controls. All digestions of fO1/rO1 PCR products from peach samples showed a PD profile, while no ESFY profile was detected. All samples were positive with specific primers *Imp* PD A/B. None of the peach samples were positive with the specific *Imp*-ESFY primers.

Sequencing of R16 and *Imp* PDA/B amplicons revealed the presence of a stable isolate. The sequences were submitted to the European nucleotide archive (ENA) with the Acc. No. HG737345 and HG737344. Based on the 16S rDNA sequence this strain is 100% homologous to the reference strain PD1 (Genebank Acc. No. AJ542543) and 99.55 % homologous to strain PD 33 Lib (Genebank Acc. No. FN 600725) based on the *Imp* gene sequence.

This is the first report of PD phytoplasma in peach trees in Spain, and the first report in Europe of PD phytoplasma causing economically important outbreaks in peach orchards, following a pattern that could be similar to PYLR in North-America. This strain is genetically closer to some European or Middle-Eastern PDs than to North-American PYLR.

References:

- Blomquist, C. L., Kirkpatrick, B. C. 2002. Identification of phytoplasma taxa and insect vectors in Peach yellow leaf disease in California. *Plant Disease* 86: 759-763.
- Danet, J.L., Balakishiyeva, G., Cimerman, A., Sauvion, N., Marie-Jeanne, V., Labonne, G., Laviña, A., Batlle, A., Krizanac, I., Skoric, D., Ermacora, P., Serçe, C.U., Çaglayan, K., Jarausch, W., Foissac, X. 2011. Multilocus sequence analysis reveals the genetic diversity of European fruit tree phytoplasmas and supports the existence of inter-species recombination. 2011. *Microbiology* 157: 438- 450.
- Cieslinska, M. 2011. Less common phytoplasmas infecting stone fruit trees. *Journal of Plant Protection Research* 51: 435-440.
- Garcia-Chapa, M., Medina, V., Viruel, M.A., Laviña, A, Batlle, A. 2003. Seasonal detection of Pear decline Phytoplasma by nested-PCR in different pear cultivars. *Plant Pathology* 52: 513-520.
- Purcell, A. H., Nyland, G., Raju, B. C., Heringer, M. R. 1981. Peach yellow leaf roll epidemic in Northern California; effects of peach cultivar, tree age, and proximity to pear orchards. *Plant Disease* 65: 365-368.
- Sabaté, J., Laviña, A., Batlle, A. 2007. Survey of *Cacopsylla pruni* in different fruit tree producing areas of Spain. *Bulletin of Insectology* 60 (2): 193-194.
- Seemüller, E., Schneider, B. 2004. 'Candidatus Phytoplasma mali', 'Candidatus Phytoplasma pyri' and 'Candidatus Phytoplasma prunorum', the causal agents of apple proliferation, pear decline and European stone fruit yellows, respectively. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology* 54: 1217-1226.

Capítol 4: Epidemiologia de 'Candidatus Phytoplasma solani' en vinya

Títol: Incidència de 'Candidatus Phytoplasma solani' a diferents àrees vitivinícoles d'Espanya i distribució d'aïllats en plantes i insectes vectors

Article resumit

S'han estudiat la incidència de 'Ca. P. solani', les poblacions del vector *Hyalesthes obsoletus*, i la capacitat per a hostatjar tant el patogen com el vector de diferents males herbes. També s'han estudiat genèticament els aïllats presents de 'Ca. Phytoplasma solani' a tots tres, vinyes, vectors i males herbes. L'estudi s'ha realitzat durant quatre anys a les plantacions de vinya de les cinc comunitats de la vall de l'Ebre (Aragó, Catalunya, La Rioja, Navarra i País Basc). A les dotze zones vitivinícoles diferents estudiades, les incidències obtingudes variaven entre un 1% i un 75%, essent les més altes al Somontano, Navarra baja i La Rioja alta i a les varietats Chardonnay i Garnatxa. Les poblacions del vector van ser en general baixes comparades amb els països veïns, fins i tot en els pics de captura, variant entre 0.25 i 5 individus per aspiració. Els pics poblacionals del vector varien amb els anys i les localitats, depenent principalment de les temperatures i els hostes (*Convolvulus arvensis* o *Urtica dioica*), podent presentar-se des de finals de maig fins a finals de juliol. S'ha comprovat que el vector té una generació a l'any i és present als marges de la gran majoria de les parcel·les infectades. La taxa mitjana de *H. obsoletus* portadors del fitoplasma va ser del 55%, arribant a l'Aragó fins al 76%, taxa molt elevada i que justifica les altes incidències en parcel·les fins i tot amb poques captures del vector. La gran majoria de les parcel·les tenien poblacions importants de l'espècie espontània *C. arvensis*, hoste del patogen i del vector. Per contra, l'altra espècie hoste *U. dioica*, no es troba present als marges de les vinyes, i només se n'han localitzat alguns individus en llocs humits relativament allunyats de les parcel·les. S'ha determinat la soca *tuf-b* de 'Ca. P. solani', associada a *C. arvensis*, com a majoritària a totes les àrees tant en vectors com en vinyes, excepte en les vinyes d'algunes parcel·les de La Rioja i de Navarra on ho era la soca *Tuf-a*. Tant en insectes com en *C. arvensis*, només es va detectar la soca *Tuf-b* a totes les àrees.

L'estudi del gen *Vmp1*, que presenta molta més variabilitat, ha revelat la presència de quatre aïllats en vinyes i vectors amb diferent distribució geogràfica. Malgrat aquesta major variabilitat, no s'ha atribuït pel moment cap implicació biològica o epidemiològica clara a aquests aïllats, però són d'utilitat per a rastrejar els diferents cicles patològics. En aquest estudi ha quedat clara la associació entre la presència del vector i la malaltia, descartant-se que altres espècies de cicadel·les tinguin un paper important en la transmissió de 'Ca. P. solani' a les vinyes. Per altra banda, queda per resoldre i clarificar l'origen, cicle i implicacions de l'aïllat *Tuf-a* detectat únicament en vinyes de La Rioja i de Navarra. Respecte a aquest aïllat més virulent, cal restar alerta de la seva possible dispersió, ja sigui en el seu hoste habitual *U. dioica* o a nous hostes, que suposaria un increment de la incidència i de la severitat de les infeccions. Amb les dades obtingudes, queda clar que 'Ca. P. solani' està àmpliament difós en vinyes de tot Espanya, i que l'estratègia de lluita ha d'anar encaminada a la minimització dels efectes i a la convivència amb la malaltia, però no a la eradicació. El fet que la principal planta hoste salvatge del vector i de la malaltia sigui present majoritàriament a les vinyes, i que el seu control com a mala herba sigui un problema, evidencia la dificultat del control total de la malaltia. Les estratègies de lluita a seguir han d'anar encaminades a disminuir tots els factors del cicle patològic: fonts d'inòcul, nivells de població, moviments i taxes d'infecció del vector. També s'ha de procurar la plantació de varietats més tolerants i afavorir el "recovering" de les plantes malaltes.

Incidence of Bois Noir phytoplasma in different viticulture regions of Spain and Stolbur isolates distribution in plants and vectors

Jordi Sabaté, Amparo Laviña & Assumpció Batlle

IRTA, Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries, Ctra Cabrils km 2, 08348 Cabrils, Barcelona, Spain

European Journal of Plant Pathology 139: 185-193. DOI 10.1007/s10658-014-0378-9

Abstract

The incidence of Bois Noir (BN) disease in grapevine plots, the population of the vector *Hyalesthes obsoletus*, and the distribution of stolbur phytoplasma isolates were studied over a 4 year period in five regions of Spain. BN incidence in affected plots ranged from 1 to 75 %. A study of the *H. obsoletus* population indicated that individuals of this insect vector were identified in most of the sampled plots with low populations, from 0.25–5 individuals per aspiration. The population peaks of *H. obsoletus* were reached at different dates between June 6th and July 24th, depending on the sampled zone and the year. The percentage of *H. obsoletus* individuals carrying the phytoplasma showed an average of 55 %. In Aragon, this percentage rose to 76 %. The strain *tuf-b* of stolbur phytoplasma was the most prevalent type in grapevine plants and *H. obsoletus*, except in grapevine plants from La Rioja where the strain *tuf-a* was detected in most plants. A study of the *vmp1* gene revealed the presence of four different isolates in grapevine plants and *H. obsoletus*.

Introduction

Bois noir disease (BN) is one of the most important grapevine yellows in Europe and is induced by 'Candidatus Phytoplasma solani' (Quaglino et al. 2013) belonging to the stolbur ribosomal group (16SrXII-A) (Lee et al. 1998). Phytoplasmas in the 16SrXII-A taxonomic subgroup are associated with Stolbur disease in a wide range of wild and cultivated plants in continental and Mediterranean Europe, causing severe losses of annual crops. In grapevine, this phytoplasma is responsible for BN diseases and is vectored by the polyphagous planthopper *Hyalesthes obsoletus* Signoret from vineyard weeds to grapevines (Maixner 1994; Sforza et al. 1998), though other insects such as *Reptalus panzeri* and *R. quinquecostatus* have also been reported as potential vectors of this phytoplasma in vineyards in Hungary as well as in Italy (Palermo et al. 2004; Pinzauti et al. 2008; Trivellone et al. 2005). Recently, *Reptalus panzeri* has been reported as a vector of BN in Serbia (Cvrković et al. 2013). Molecular characterization of the isolates in plants and insects is an important tool to find out more about the vectors and the host plants involved in the dissemination of the disease. PCR-RFLP analysis of sequences of the gene encoding the elongation factor Tu (*tuf* gene) have allowed to distinguish three different stolbur isolates associated to different epidemiological cycles in the vector *H. obsoletus* as well as in infected grapevines and wild hosts, *tuf* type a (VK1), *tuf* type b (VK2) and *tuf* type c (VK3) associated to *Urtica dioica*, *Convolvulus arvensis* and *Calystegia sepium*, respectively (Langer and Maixner 2004). Evidence for the genetic diversity of stolbur increased when the *vmp1* gene which encodes a putative membrane protein, was analysed (Cimerman et al. 2009; Pacifico et al. 2009). In Spain, BN disease was first identified in 1994 (Laviña et al. 1995), but in recent years its incidence seems to have increased in different wine regions (Sabaté et al. 2007). For this reason, a study was undertaken in various regions and in different grapevine varieties of the disease incidence, of the *H. obsoletus* population and of the distribution of stolbur phytoplasma isolates in plants and insects.

Material and methods

Bois Noir presence in grapevine plots

The study was carried out in several viticulture areas belonging to five regions of Spain; Aragon, Basque country, Catalonia, La Rioja and Navarre. The survey was carried out with the assessment of regional phytopathological sanitary services to find the most representative and severely infected plots in each characteristic wine production area or denomination of origin (D.O.). During 2006, 2007, 2008 and 2009 samplings were carried out to determine the presence and the incidence of the phytoplasma in vineyards, but incidence was not followed in all plots in different years. First year sampling incidence, in the majority of the plots 2006, was taken as a reference incidence.

In each plot, the number of grapevine plants affected by BN symptoms, or the Bois Noir incidence (BNI) was evaluated. Samplings were carried out on 29 affected plots growing different varieties: Tempranillo (10), Chardonnay (8), Grenache (8), Macabeu (2) and Parellada (1). To standardize the data and minimize the border effect of fields very different in shape and size, BN phytoplasma infection was estimated for each affected plot by the visual inspection of 500 plants (20×25) in a single big central block. Incidence and samples for analysis were taken at the same time, before leaf-fall in autumn, when BN detection and symptom expression is optimum. Shoot samples were taken from plants showing symptoms of phytoplasma infection (up to a maximum of 10 samples per field). To ensure phytoplasma detection, as BN is irregularly distributed, five shoots were collected from different parts of each plant and stored at 4 °C until examination.

Insects capture

The *H. obsoletus* population was also surveyed in affected BN plots suspected of active spreading to increase the possibilities to find potential vectors in a 4 year study period in several plots per viticulture area, from June to September. Due to a high heterogeneity of agro-ecological conditions and weed communities, in the sampled area (Ebro Basin), insect capture was focused on major known *H. obsoletus* hosts, *C. arvensis* and *U. dioica*. Insects were captured weekly with a 25 cm diameter aspiration surface D-Vac on *C. arvensis*, in four repetitions per plot. Aspirations were carried out lineally,

walking 2 min and covering 20 linear metres approximately (0.25 m×20 m=5 square metres). The insects were classified and stored in Eppendorf tubes at -20 °C until analysis.

Phytoplasma detection in plants and insects

Samples of grapevine plants as well as individuals of *H. obsoletus* were analysed. The PCR technique was used for phytoplasma detection in both plants and insects. Total DNA was isolated from a 1 g mixture of fresh plant material (leaf midribs, buds and stems) using the phytoplasma-enrichment procedure of Ahrens and Seemüller (1992) and stored at -20 °C until examination and from single *H. obsoletus* individuals, fresh or stored frozen at -20 °C (Batlle et al. 2008). For preliminary BN diagnosis, nested PCR was used for specific detection of the stolbur phytoplasma. The universal primers for phytoplasma detection, P1/P7 (Deng and Hiruki 1991; Smart et al. 1996), located at the 16S rDNA and 23S rDNA gene, respectively, were used in the first step to amplify a fragment of about 1800 base pairs (bp) in length. The second step was performed with the universal primers fU5/rU3 (Lorenz et al. 1995) or fstol/rstol-specific primers (Maixner et al. 1995). These primers amplify the 16S rDNA gene from the stolbur group, producing a fragment about 570 bp in length. The first amplification was carried out in a total volume of 20 µl containing 5–10 ng of DNA and the following mixture: 0.250 µM of each universal primer, 250 µM dNTPs, 0.5 units Taq DNA polymerase (Promega) and 1 x Taq buffer. Two microliters of 1:50 dilution of the first amplification product were used for the second step. The second amplification mixture contained the same components, but a different specific primer concentration (0.375 µM each). Products were analysed by electrophoresis in a 1.5 % D-1 agarose gel (Pronadisa, Madrid, Spain) according to standard procedures. DNA was stained with ethidium bromide and exposed to ultraviolet light. To confirm each isolate as a member of the 16SrXIIA subgroup, nested PCR amplicons from fU5/rU3 PCR were digested with TruI. Grapevines without symptoms and healthy *Catharanthus roseus* seedlings were used as negative controls in PCR assays. The presence of different stolbur genotypes in the different regions was evaluated using PCR-RFLP analyses of *tuf* and *vmp1* genes, codifying for a Tu elongation factor and for a membrane protein. *Tuf* types were analysed by nested-PCR with Tuf 1f/r primers in the first step and Tuf AY primers in

the second step (Langer and Maixner 2004). Variability in the *vmp1* gene ("V" types) was analysed by nested-PCR with StolH10 primers in the first step and TYPH 10 primers in the second step (Murolo et al. 2010). RFLP analyses were performed with HpaII and RsaI enzymes, respectively (Langer and Maixner 2004; Pacifico et al. 2009).

Results

Bois Noir Incidence (BNI)

The results revealed high BNI in various areas and plots of La Rioja, Navarra and Aragon, whereas the disease incidence was low in Catalonia and Basque country (Rioja Alavesa) (Table 1). The phytoplasma was detected mainly in the varieties Chardonnay in Aragon and Catalonia and Grenache and Tempranillo in La Rioja, Basque country and Navarre. In La Rioja, the highest number of plots with affected grapevine plants was located in La Rioja Alta. In three sampled plots of the variety Grenache of this region (Arenzana, Manjarrés and Cardenas), the percentage of grapevine plants with symptoms was in some cases as high as 75 %. Some affected plots were also identified of the variety Tempranillo in La Rioja Baja in the localities of Autol, Navarrete and Tudelilla, but with a low incidence of 2-10 %. In Aragon, the highest number of plots with symptoms was located in the region of Somontano, especially in the variety Chardonnay. BNI in the sampled plots of Aragon ranged from 40 % in Tempranillo to 75 % in Chardonnay. In Navarre, the highest number of plots with symptoms was found in the Ribera Baja region (Monteagudo and Cascante). In the affected plots of these localities BNI ranged between 50 and 70 %, whereas in Ribera Alta (Saso) the number of affected plots was low, and BNI in the affected plots was lower than 10 %. In Basque country (Rioja Alavesa), incidence of the disease was low, and only some affected plots of the variety Tempranillo were identified with an incidence that did not exceed 5 %. In Catalonia, BNI was low and varied strongly by viticulture area. In Conca de Barbera and Costers del Segre plots with an incidence in the plots about 20 % was determined. The variety Chardonnay was the most affected in these region, though other varieties with affected plants were also identified, including Grenache Gris, Macabeu and Parellada. Affected plots were also identified in the Catalonian viticulture areas of Terra Alta, Bages, Empordà and Penedès (Table 1).

***Hyalesthes obsoletus* population and percentage of individuals carrying the phytoplasma**

The insect trapping surveys showed that the main vector of BN, *H. obsoletus*, was present in all the geographical areas sampled. Any *U. dioica* was found in vineyards, and all aspirations were made on *C. arvensis*. Due to weed control strategy in vineyards in Spain (continued ploughing) in a dry climate with non-irrigation, weed population in vineyards is very low and homogeneous in summer; there are weeds only where the plough is not effective, just behind the vine trunks. The dominant weed inside sampled vineyards was *C. arvensis* followed so far by *Poligonum aviculare* and *Solanum nigrum*. *C. arvensis* is at this time one of the most important weed control problems in Spanish vineyards, especially behind trunks binding to espaliers, and is the dominant weed inside sampled vineyards. Any *U. dioica* inside the edges of any vineyard was found (especially searched in plots with tuf a isolate detected in vines). An important population of *Convolvulus althaeoides* in a Pla del Penedès plot edges was systematically aspired without any *H. obsoletus* capture. Any other *Cixiidae* specie reported as a potential vector of phytoplasmas was captured. The highest number of individuals was recorded in Navarre and Aragon. The maximum per aspiration in Aragon ranged between one individual in 2008 and five in 2009; whereas in the plots of Basque country, the population of *H. obsoletus* was lower, 0.75 individuals per aspiration in 2007 (Fig. 1). In Catalonia, the number of *H. obsoletus* captured varied with the year and the sampled area (Fig. 1). The highest number of individuals was captured in Conca de Barberà, Costers del Segre and Terra Alta, while in Penedès either none or very few were captured (Fig. 1, Table 2). In the samplings of 2009, a low number of *H. obsoletus* were identified in other regions of Spain (Extremadura and Valencia) for the first time (Fig. 1). The peaks of population of *H. obsoletus* were reached at different dates between June 6th and July 24th, depending on the sampled zone and year (Fig. 1). The percentage of *H. obsoletus* individuals carrying the phytoplasma showed an average of 55 %. In Aragon, this percentage rose to 76 % (Table 2).

Molecular characterization of stolbur isolates

The PCR-RFLP analyses showed two profiles with *tuf* primers (*tuf* type-a and *tuf* type-b) and four with TYPH 10 primers for *vmp-1* gene (V1, V15, V4 and V3) (Tables 1, 2, and 3). The stolbur *tuf* type-b was detected in most of the grapevine samples except in those from La Rioja, in some plants from Navarre, and in one plant from Aragon where *tuf* type-a was detected. In all individuals of *H. obsoletus* captured in the five regions the strain detected was *tuf* type-b (Table 1, 2, and 3). In terms of diversity of the *vmp1* gene, four profiles were identified. Only three "V" types were identified in the 61 grapevine samples analysed: 57 % V1, 38 % V3 and 5 % V15. Three profiles were also identified in 56 individuals of *H. obsoletus*: 75 % V1, 22 % V15 and 3 % V4. No *H. obsoletus* carriers of V3 type have been identified to date. In grapevine plants, V1 was the only isolate identified in all sampling sites from Catalonia. The V1 isolate was also the most prevalent in Aragon and Navarre, with just one sample in Aragon with the V15 isolate and one other with the V3 isolate. In Navarre, two samples with V3 isolate were identified. The V3 isolate was the only one identified in all samples from La Rioja Alta. In La Rioja Baja, both V3 and V1 were identified (Table 1). The V1 strain was detected in all individuals of *H. obsoletus* captured in Navarre and Basque country (Rioja Alavesa). In Aragon and La Rioja, the V1 strain was the most prevalent identified in *H. obsoletus*, though the V15 isolate was also detected in a few individuals of both regions. In Catalonia, both V1 and V15 isolates were identified (Table 2).

Discussion

The samplings conducted during 4 years in several viticulture areas belonging to five regions of Spain indicated that BN disease was widespread in the five regions (Table 1). The most affected varieties were Grenache and Chardonnay. The number of plants showing symptoms in the affected plots was higher in these varieties than in Tempranillo, despite the latter being the most cultivated variety in La Rioja and other viticulture areas of Spain. The BNI in each cultivar varied according to the region. For Grenache, the presence of BNI ranged from 40 % in Aragon to 75 % in La Rioja; whereas for Tempranillo, it ranged from 1 % in Basque country (Rioja alavesa) to 40 % in Aragon. As for the Chardonnay cultivar, the incidence of plants with symptoms

ranged from 5 % in some plots of Catalonia (Terra Alta) to 75 % in plots of Aragon (Estadilla). Though other insect species have been found capable of transmitting stolbur phytoplasma to a feeding medium and to different crop species (Batlle et al. 2008; Sabaté et al. 2006), it seems that the spread of the disease is highest in those areas where *H. obsoletus* is present. The high incidence in plots in the Somontano region in Aragon or in the plots of Navarre is related to the high population of *H. obsoletus*. In other regions where BNI is low so is the presence of *H. obsoletus*. Although few specimens of *H. obsoletus* were captured on grapevine, it is likely that their high infectivity is enough to ensure a constant rate of BN transmission throughout the season. The percentage of *H. obsoletus* specimens that were carriers of the phytoplasma was high compared with that of other phytoplasma vectors (Batlle et al. 2008; García-Chapa et al. 2005). An average of 55% of the specimens tested positive for the phytoplasma. This result concurs with those obtained by Weber and Maixner (1998) and Lessio et al. (2007). In Italy, more than one third of the specimens analysed carried the Stolbur phytoplasma (Lessio et al. 2007). According to the results obtained in this study, the strain *tuf*-type b was the most prevalent in the regions studied in Spain. This stolbur isolate was identified in all the *H. obsoletus* specimens and all grapevine plants with the exception of the plants from La Rioja Alta and a few plants from La Rioja Baja, Somontano (Aragon) and Navarre. The molecular characterization of the stolbur isolates from grapevine, host plants, as well as from *H. obsoletus*, allows us to understand the epidemiology of this disease in each geographical area. In Spain, the phytoplasma was detected mainly in bindweed which is one of the major natural reservoirs in vineyards and plays an important epidemiological role in insect vector maintenance in the environment (Weber and Maixner 1998; Mori et al. 2007). The strain *tuf*-type b associated with this plant host is also the most widespread. Nevertheless, the increase in the spread of this disease observed in other countries like Germany revealed that it was the strain type-a associated with *U. dioica*, which was spreading fastest (Maixner et al. 2009). In Italy, the BN isolate *tuf* type-a, associated with nettle plants, was also the most prevalent type identified, confirming the close association between the vector and nettle as its natural host in north-western Italy. In this country, where the disease occurred only recently, 87 % of PCR positive vines were infected by *tuf* type-a. Where BN was already present and spreading faster, 79 % of the vines were infected by this type compared to only 7%

at locations with a history of BN (Lessio et al. 2007). The molecular characterization of stolbur isolates by means of study of the *vmp1* gene which codifies for a membrane protein might also help to explain why the incidence of the disease is low in certain localities despite similar populations of *H. obsoletus* to those identified in other places with a higher incidence of the disease. In our case, through a study of the *vmp1* gene it was possible to split the strain *tuf* type-b into three profiles, V1, V15 and sporadically V4. This might explain the lower incidence of the disease in some specific locations of Catalonia (Terra Alta, Bages and Alt Penedes), where the vines are infected mainly with V1 strain and the individuals of *H. obsoletus* are carriers of the V15 or V4 strain. Probably, in these localities *H. obsoletus* transmits the strains V15 and V4 among other host plants, but not to the grapevines. However, in Conca de Barberà and Costers del Segre (Poblet and Vallbona), where the incidence of the disease is slightly higher, both plants and insects are carriers of the V1 strain. The same correlation also exists in the plots of Aragon (Viñas del Vero and Estadilla) and in two out of three plots of Navarra where both plants and insects are also carriers of the V1 isolate. Comparison of stolbur Spanish *vmp1* isolates and others present in the neighbouring European countries, shows that Spanish isolates' distribution is quite different. V1 is the prevalent isolate in Spain and France, and is rare in Italy, followed by V3 that is prevalent in Italy and the third one in France. V4 is the second most detected in France and rare in Italy, in Spain it has been detected only in two specimens of *H. obsoletus*. V15 has been detected both in vines and *H. obsoletus* in Spain, it is not present in France, and is present in Italy in low numbers (Pacífico et al. 2009; Murolo et al. 2010). These results confirm that the stolbur isolates' variability and distribution is not homogeneous in Europe. The *tuf*-a strain, obtained with the elongation factor Tu gene and associated preferably to *Urtica dioica*, seems to match in our case the V3 profile obtained after studying the *vmp1* gene. In Spain, this isolate has been identified only in grapevine plants of La Rioja, in a plot of Navarra (Saso) and in one plant of a plot of Aragon (Estadilla), although no individuals of *H. obsoletus* have been identified yet as carriers of this isolate. This discordance in La Rioja Alta, where plants and *H. obsoletus* are carriers of different isolates (*tuf* type-a in plants and *tuf* type-b in *H. obsoletus*), could be explained by different causes. Other vectors might be involved in the spread of the disease. In previous studies, different species of *Cicadellidae* and *Fulgoridae* have shown the

capacity to transmit the disease under experimental conditions (Batlle et al. 2000; Sabaté et al. 2006). On the other hand, it could be possible that the *H. obsoletus* population responsible for transmission to the vines is outside the vineyards in non-sampled plants. The coincidence of better growing conditions for *U. dioica* in the surroundings of vineyards in La Rioja than in other plots, and the presence of *tuf-a* isolate makes this plant the major candidate to host the *H. obsoletus* population and stolbur strain responsible of these vineyards infection. In fact, work concerning the search for *H. obsoletus* carrying the Tuf-a strain in *U. dioica* is being conducted in the same region.

Acknowledgments

We would like to thank J. Legorburu from Neiker (Vitoria-Gasteiz), J. Fortanete and A. Sorolla from Centro de Protección Vegetal (Zaragoza), J.J. Perez de Obanos and L. Caminero from EVENA (Navarra), J.L. Perez Marin from Rioja, and J. Reyes and G. Barrios from DAAM- Servei Sanitat Vegetal (Catalonia) for their help in conducting the surveys. This work was funded by grant RTA11-067-C4 of the Programa Sectorial de I+D, M.A.P.A., Spain

References

- 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 16SrRNA gene. *Phytopathology*, 82, 828–832.
- Batlle, A., Martinez, M. A., & Laviña, A. (2000). Occurrence, distribution and epidemiology of grapevine yellows in Spain. *European Journal of Plant Pathology*, 106, 811–816.
- Batlle, A., Altabella, N., Sabaté, J., & Laviña, A. (2008). Study of the transmission of Stolbur Phytoplasma to different crop species, by *Macrosteles quadripunctulatus* (Kirschbaum). *Annals of Applied Biology*, 152, 235–242.
- Cimerman, A., Pacifico, D., Salar, P., Marzachi, C., & Foissac, X. (2009). Striking diversity of *vmp1*, a variable gene encoding a putative membrane protein of the stolbur phytoplasma. *Applied Environmental Microbiology*, 75, 2951–2957.

- Cvrković, A., Jović, J., Mitrović, M., Krstić, O., & Toševski, I. (2013). Experimental and molecular evidence of *Reptalus panzeri* as a natural vector of bois noir. *Plant Pathology*. doi:10.1111/ppa.12080.
- Deng, S., & Hiruki, C. (1991). Amplification of 16S rRNA genes from culturable and non-culturable mollicutes. *Journal of Microbiological Methods*, 14, 53–61.
- García-Chapa, M., Sabaté, J., Laviña, A., & Batlle, A. (2005). Role of *Cacopsylla pyri* in the epidemiology of pear decline in Spain. *European Journal of Plant Pathology*, 111, 9–17.
- Langer, M., & Maixner, M. (2004). Molecular characterization of grapevine yellows associated phytoplasmas of the stolbur group based on RFLP-analysis of non-ribosomal DNA. *Vitis*, 43(4), 191–199.
- Laviña, A., Batlle, A., Larrue, J., Daire, X., Clair, D., & Boudon- Padieu, E. (1995). First report of grapevine bois noir phytoplasma in Spain. *Plant Disease*, 79, 1075.
- Lee, I. M., Gundersen, 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*, 48, 1153–1169.
- Lessio, M., Tedeschi, R., & Alma, A. (2007). Population dynamics, host plants and infection rate with stolbur phytoplasma of *Hyalesthes obsoletus* Signoret in North-Western Italy. *Journal of Plant Pathology*, 89(1), 97–102.
- 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, 771–776.
- Maixner, M. (1994). Research note: transmission of German grapevine yellows (Vergilbungskrankheit) by the planthopper *Hyalesthes obsoletus* (Auchenorrhyncha: Cixiidae). *Vitis*, 33, 103–104.
- Maixner, M., Ahrens, U., & Seemüller, E. (1995). Detection of the german grapevine yellows (vergilbungskrankheit) MLO in grapevine, alternative hosts and a vector by a specific PCR procedure. *European Journal Plant Pathology*, 101, 241–250.
- Maixner, M., Johannesen, J., & Seitz, A. (2009). Aspects of the interaction of stolbur phytoplasma, vectors and host plants in the two epidemic systems of Bois Noir. *Proceedings of 16th Meeting of ICVG*. France: Dijon.

- Mori, N., Pavan, F., Bondavalli, R., Reggiani, N., Paltrinieri, S., & Bertaccini, A. (2007). Factors affecting the spread of “bois noir” disease in grapevine cv. Lambrusco in northern Italy. *Bulletin of Insectology*, 60, 295–296.
- Murolo, S., Marcone, C., Prota, V., Garau, R., Foissac, X., & Romanazzi, G. (2010). Genetic variability of the stolbur phytoplasma vmp1 gene in grapevines, bindweeds and vegetables. *Journal of Applied Microbiology*, 109(6), 2049–2059.
- Pacifico, D., Alma, A., Bagnoli, B., Foissac, X., Pasquini, G., & Tessitori, M. (2009). Characterization of Bois noir isolates by restriction fragment length polymorphism of a stolbur-specific putative membrane protein gene. *Phytopathology*, 99, 711–715.
- Palermo, S., Elekes, M., Botti, S., Ember, I., Alma, A., & Orosz, A. (2004). Presence of stolbur phytoplasma in Cixiidae in Hungarian vineyards. *Vitis*, 43, 201–203.
- Pinzauti, F., Trivellone, V., & Bagnoli, B. (2008). Ability of *Reptalus quinquecostatus* (Hemiptera: Cixiidae) to inoculate stolbur phytoplasma to artificial feeding medium. *Annals of Applied Biology*, 153, 299–305.
- Quaglino, F., Zhao, Y., Casati, P., Bulgari, D., Bianco, P.A., & Wei, W. (2013). ‘Candidatus *Phytoplasma solani*’, a novel taxon associated with stolbur and bois noir related diseases of plants. *International Journal Systematic Evolutionary Microbiology*, 63, 2879–2894.
- Sabaté, J., Laviña, A. & Batlle, A. (2006). Molecular characterization of stolbur phytoplasma isolates in grapevines and insect vectors. 15th ICGV Symposium, Stellenbosch (South Africa). Extended Abstracts pp-157–158.
- Sabaté, J., Laviña, A., Legorburu, J., Fortanete, J., de Pérez Obanos, J. J., & Pérez Marín, J. L. (2007). Incidence of Bois Noir phytoplasma in different wine-growing regions of Spain and its relation to *Hyalesthes obsoletus*. *Bulletin of Insectology*, 60(2), 367–368.
- Sforza, R., Clair, D., Daire, X., Larrue, J., & Boudon-Padieu, E. (1998). The role of *Hyalesthes obsoletus* (Hemiptera: Cixiidae) in the occurrence of bois noir of grapevines in France. *Journal of Phytopathology*, 146, 549–556.
- Smart, C. D., Schneider, B., Blomquist, C. L., Guerra, L. J., Harrison, N. A., Ahrens, U. (1996). Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of the 16S-23S rRNA spacer region. *Applied Environmental Microbiology*, 62, 1988–1993.

- Trivellone, V., Pinzauti, F., & Bagnoli, B. (2005). *Reptalus quinquecostatus* (Dufour) (Auchenorrhyncha Cixiidae) as a possible vector of Stolbur-phytoplasma in a vineyard in Tuscany. *Redia*, 88, 103–108.
- Weber, A., & Maixner, M. (1998). Survey of populations of the planthopper *Hyalesthes obsoletus* Sign. (Auchenorrhyncha, Cixiidae) for infection with the phytoplasma causing grapevine yellows in Germany. *Journal of Applied Entomology*, 122, 375–381.

Table 1.-Percentage of BN infection in several grapevine varieties of different viticulture areas of Spain and molecular characterization of stolbur isolate.

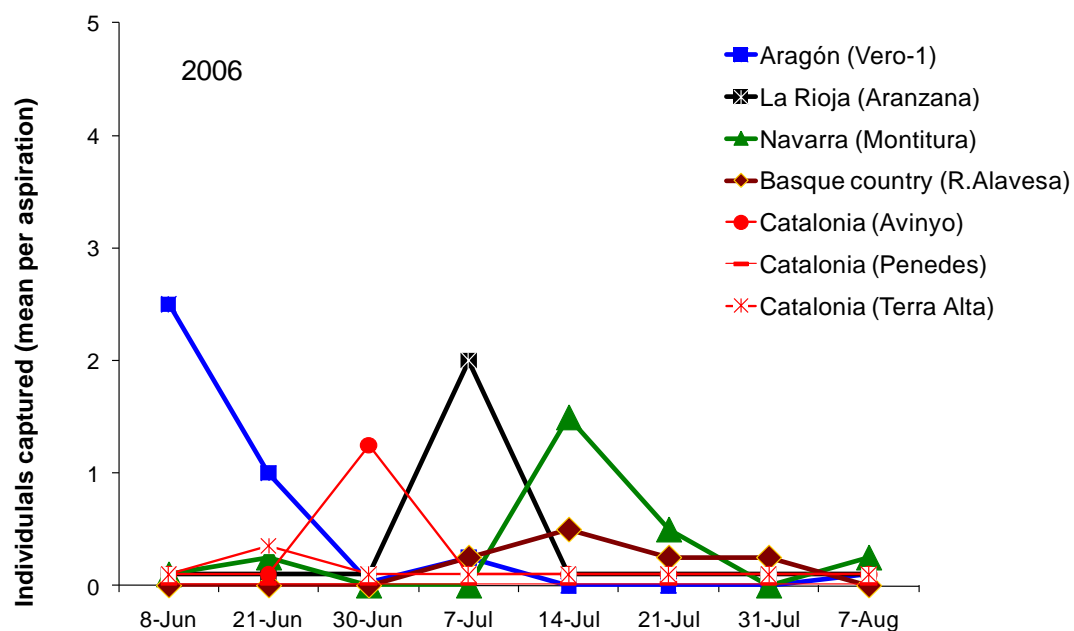
Region	Location	Variety	BN	Isolates identification	
			Incidence	Tuf strain	Vmp1 strain
Aragon					
	Somontano				
	Vero 1	Chardonnay	55%	Tuf b	V1/V15
	Vero 2	Chardonnay	53%	Tuf b	V1
	Estadilla	Tempranillo	53%	Tuf a	V3
	Estadilla	Chardonnay	75%	Tuf b	V1
	Salas	Chardonnay	45%	Tuf b	V1
	Calatayud				
	Atea	Tempranillo	40%	n.a.	n.a.
	Munébrega	Grenache	40%	n.a.	n.a.
Basque country					
	Rioja Alavesa				
	Morrolavieja	Tempranillo	1%	n.a.	n.a.
	Carrabaños	Tempranillo	4%	n.a.	n.a.
Catalonia					
	Bages				
	Avinyo	Tempranillo	4%	Tuf b	V1
	Conca Barberà				
	Poblet	Chardonnay	20%	Tuf b	V1
	Costers del Segre				
	Vallbona	Chardonnay	20%	Tuf b	V1
	Vallbona	Perellada	5%	Tuf b	V1
	Vallbona	Macabeu	15%	Tuf b	V1
	Terra Alta				
	Corbera	Grenache gris	5%	Tuf b	V1
	Batea	Grenache gris	5%	Tuf b	V1
	Caseres	Macabeu	10%	Tuf b	V1
	Penedès				
	Pla de Penedes	Chardonnay	10%	Tuf b	V1
	Fransola	Chardonnay	10%	Tuf b	V1
La Rioja					
	La Rioja baja				
	Tudelilla	Tempranillo	10%	n.a.	n.a.
	Navarrete	Tempranillo	10%	Tuf a	V3/V1
	Autol	Tempranillo	2%	n.a.	n.a.
	La Rioja alta				
	Cardenas	Grenache	70%	Tuf a	V3
	Manjarrés	Grenache	75%	Tuf a	V3
	Arenzana	Grenache	70%	Tuf a	V3
	Arenzana	Tempranillo	65%	Tuf a	V3
Navarre					
	Ribera alta				
	Saso	Tempranillo	10%	Tuf a/Tuf b	V1/V3
	Ribera baja				
	Monteagudo	Grenache	50%	Tuf b	V1/V3
	Cascante	Grenache	70%	na	n.a.

Table 2. Percentage of *Hyalesthes obsoletus* carriers of the phytoplasma and stolbur isolates identified in them.

Region	Location	Nº years sampled	Nº <i>Hyalesthes</i> total captured (range)	Nºpositives/ Total analyzed	Stolbur isolates characterization	
					Tuf strain	Vmp 1 strain
Aragón						
	Somontano					
	Vero	3	23 (4-15)	13+/17 (76%)	Tuf b	V1/V15
	Estadilla	3	61 (18-35)	33+/46 (71%)	Tuf b	V1
Basque country						
	Rioja Alavesa					
	Morrolavieja	2	7 (2-5)	2+/7 (28%)	Tuf b	V1
	Carrabaños	2	9 (4-5)	5+/8 (62%)	Tuf b	V1
Catalonia						
	Bages					
	Avinyo	2	12 (5-7)	7+/12 (58%)	Tuf b	V15
	Penedès					
	Pla de Penedes	2	2 (0-2)	1+/2	Tuf b	V15
	Fransola	2	4 (1-3)	2+/3	Tuf b	V1
	Conca de Barberà					
	Poblet	2	18 (8-10)	8+/18 (44%)	Tuf b	V1
	Costers del segre					
	Vallbona	4	43 (8-15)	25+/43 (59%)	Tuf b	V1
	Terra Alta					
	Corbera	3	34 (1-24)	8+/32 (25 %)	Tuf b	V15/V4
La Rioja						
	La Rioja Alta					
	Cardenas	2	12 (3-9)	7+/12 (58%)	Tuf b	V1/V15
	Manjarres	2	11 (5-6)	6+/11 (54%)	Tuf b	V1
	Arenzana	2	17 (3-14)	5+/10 (50%)	Tuf b	V1
	La Rioja baja					
	Navarrete		0	0	n.a.	n.a.
Navarra						
	Ribera Alta					
	Saso	2	3 (0-3)	1+/3	n.a.	V1
	Ribera baja					
	Monteagudo	2	45 (21-24)	24+/45 (53%)	Tuf b	V1
	Cascante	3	18 (4-10)	8+/18 (44%)	Tuf b	V1

Table 3. Number of samples with *Tuf* and *Vmp-1* strains in grapevine plants and in *Hyalesthes obsoletus*.

	Grapevine			<i>Hyalesthes obsoletus</i>		
	Nº positives /total analyzed			Nº positives /total analyzed		
	V type	<i>Tuf a</i>	<i>Tuf b</i>	V type	<i>Tuf a</i>	<i>Tuf b</i>
V1	35+/61	1+/61	34+/61	42+/56	0	42+/56
V15	3+/61	0	4+/61	12+/56	0	12+/56
V4	0+/61	0	0	2+/56	0	2+/56
V3	23+/61	22+/61	1+/61	0+/56	0	0

Figure 1. Population evolution of *H. obsoletus* in different grapevine plots of Spain in 2006.

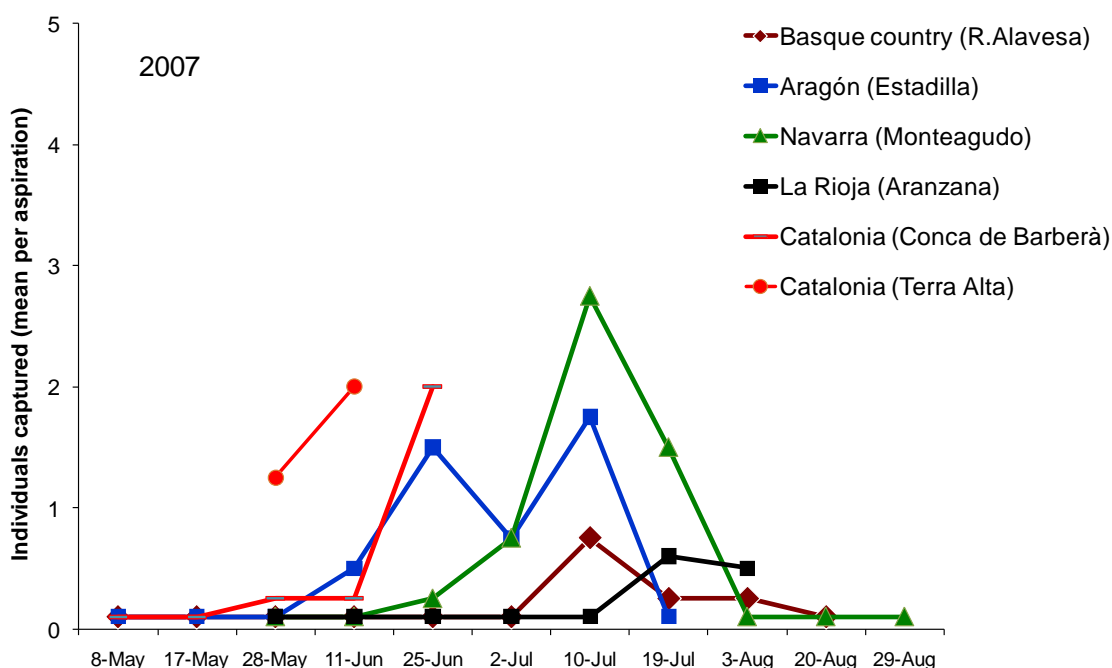


Figure2. Population evolution of *H. obsoletus* in different grapevine plots of Spain in 2007.

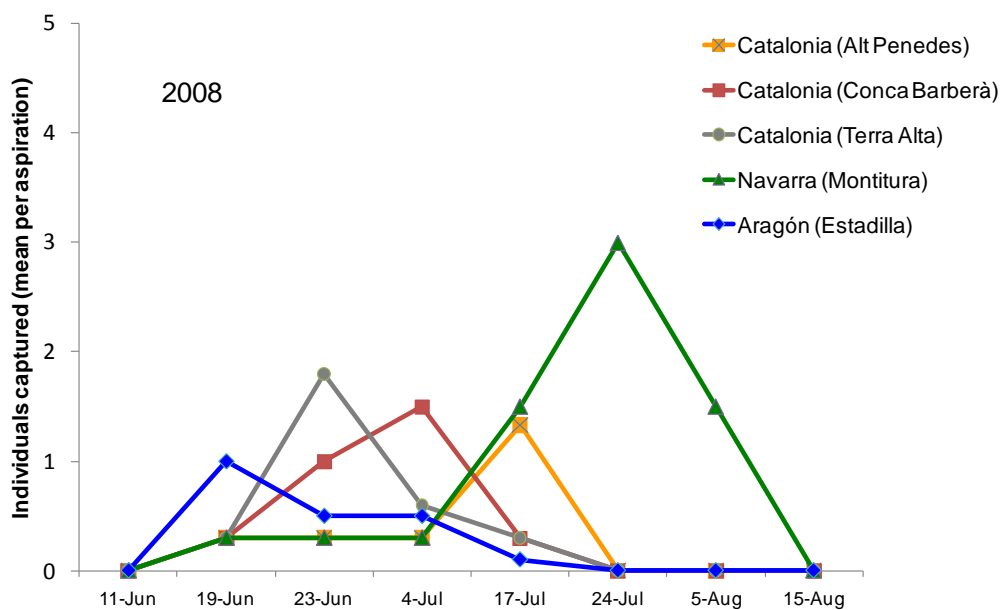


Figure3. Population evolution of *H. obsoletus* in different grapevine plots of Spain in 2008.

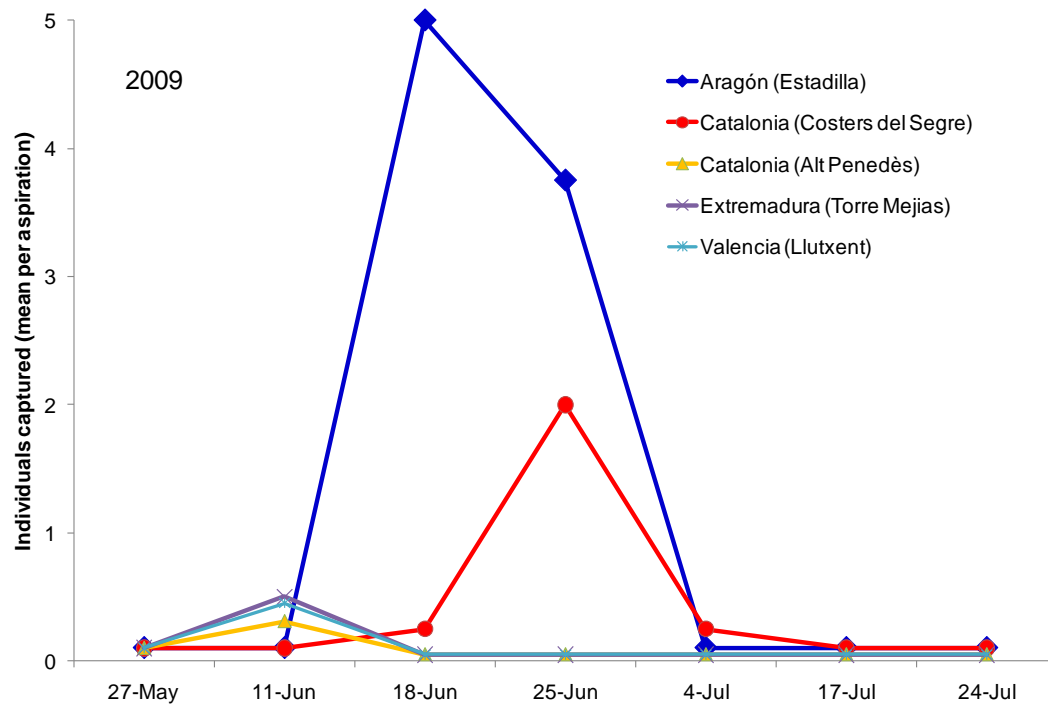


Figure 4. Population evolution of *H. obsoletus* in different grapevine plots of Spain in 2009

V DISCUSSIÓ GENERAL

La present Tesi Doctoral confirma la presència a l'Estat espanyol, i causant danys importants, de les principals fitoplasmosi dels fruiters (*Malus* spp., *Prunus* spp., *Pyrus* spp.) i de la vinya (*Vitis* spp.) a Europa. També s'ha constatat que aquestes malalties estan àmpliament distribuïdes per tota la Península Ibèrica, representant una seriosa amenaça, tan present com futura, per a la viabilitat econòmica d'aquests conreus. Cal dir, que els fitoplasmes estudiats, són tots organismes inclosos en les llistes d'especial perillositat i/o quarantena que recomana mesures a diferents nivells per evitar-ne l'expansió i proliferació, degut al seu potencial destructiu i repercussió econòmica (EPPO, 2015). Els fitoplasmes majoritàriament identificats han estat 'Ca. P. prunorum', 'Ca. P. mali', 'Ca. P. pyri' i 'Ca. P. solani', en fruiters de pinyol, pomer, perer i vinya, respectivament. Així mateix, s'ha constatat la presència dels principals vectors d'aquests fitoplasmes (*C. pruni*, *C. melanoneura*, *C. picta*, *C. pyri* i *H. obsoletus*) a moltes de les zones estudiades.

Els resultats han mostrat que les incidències elevades van associades a poblacions importants dels vectors, excepte en comptats casos, que per la joventut i grau d'afectació, molt probablement es van infectar als vivers. Aquests vectors s'han capturat i identificat també en parcel·les afectades en zones on no se n'havia confirmat la seva presència, malgrat haver-hi la malaltia. Aquests resultats confirmen que no hi ha diferències importants en quant a vectors respecte a altres parts d'Europa i la Conca Mediterrània (Carraro *et al.*, 1998a; Jarausch *et al.* 2001a; Jarausch *et al.*, 2008; Mayer *et al.*, 2009; Maixner, 2011), encara que les poblacions siguin petites i difícils de mostrejar.

També s'ha observat, descrit i identificat genèticament per primera vegada a Europa en presseguer el PYLR, l'agent causal del qual, 'Ca. P. pyri', és endèmic al nostre país en perer (Garcia-Chapa *et al.*, 2003). Malgrat que hi ha ressenyes d'infeccions molt puntuals de 'Ca. P. pyri' en fruiters de pinyol a Europa (Cieslinska, 2011b), no hi ha hagut cap brot d'aquestes característiques en presseguer. Aquest fet, a part de representar una amenaça greu per a un conreu tant important, demostra que els canvis

d'hoste entre els fitoplasmes del grup X són successos més habituals del que es pensava. Amb això, augmenta la probabilitat de la recombinació demostrada per Danet *et al.* (2011) entre els diferents fitoplasmes, afavorint l'intercanvi genètic entre els diferents fitoplasmes, i permetent una millor adaptació a noves condicions, hostes i vectors.

La millor manera de preveure i evitar els riscos que comporten les fitoplasmosi, és conèixer els cicles patològics presents i/o probables en el futur per a les diferents zones i conreus. Donat que no hi ha tractaments, ni massa varietat de material vegetal tolerant/resistent, les millors eines de control també són el coneixement d'aquests cicles patològics per a establir pautes de lluita. Els quatre fitoplasmes estudiats presenten principalment tres models epidemiològics en funció dels hostes i els vectors.

El primer tipus de cicle patològic és el que comparteixen, encara que amb petites diferències, '*Ca. P. prunorum*' i '*Ca. P. mali*'. Aquests fitoplasmes es caracteritzen per tenir un rang d'hostes habituals restringit a les espècies d'un sol gènere de plantes. Per tant, la font d'inòcul per a noves infeccions provindrà d'aquestes espècies, ja siguin conreades o salvatges. Els resultats obtinguts confirmen, com a la resta del continent (Labonne i Lichou, 2004; Mayer *et al.*, 2009) que els seus insectes vectors (*C. pruni*, *C. picta* i *C. melanoneura*) tenen una sola generació l'any, només es desenvolupen sobre uns pocs hostes primaris, i hivernen lluny d'ells. Això els obliga a grans desplaçaments migratoris entre hostes. Aquests factors condicionen la permanència i dispersió dels vectors als cultius, i per tant, la lluita i el control dels dos fitoplasmes com explica Thebaud *et al.* (2009).

Una de les diferències entre els dos fitoplasmes, '*Ca. P. prunorum*' i '*Ca. P. mali*', és en el rang d'espècies hostes, més gran en els *Prunus*, ja que presenta més diversitat i distribució geogràfica que el gènere *Malus*, representat a la Península Ibèrica per només una espècie, *M. domestica* (www.anthos.es). A més, el fet que els psíl·lids vectors amb una generació a l'any no proliferin excessivament en plantacions comercials i no constitueixin plagues (Weintraub i Jones, 2010), fa que les seves distribucions geogràfiques, coincideixin a grans trets, amb les de les poblacions d'hostes salvatges o naturalitzats. *M. domestica*, és una espècie eurosiberiana, que habita de forma natural a

zones muntanyoses o de clima atlàntic, estant *C. picta* i 'Ca. P. mali' també limitats a aquestes zones. Així ho mostren els resultats obtinguts, ja que és a les zones de clima atlàntic on hi ha les parcel·les amb les incidències i les captures de *C. picta* més elevades. Per contra, als pomerars mediterranis, lluny de les condicions ideals per als *Malus* salvatges, no s'han trobat ni la malaltia ni *C. picta*. En canvi, a Catalunya s'ha capturat *C. melanoneura*, ja que el seu hoste primari *C. monogyna* hi és relativament abundant. La presència d'aquest potencial vector, no es tradueix en infeccions, suggerint que no té un paper important en el cicle de la malaltia. Això confirma els treballs de Mayer *et al.*, (2009) indicant que aquesta capacitat de transmissió està circumscrita fins ara a la Vall d'Aosta (Tedeschi *et al.*, 2012).

En canvi, 'Ca. P. prunorum' i les diverses espècies de *Prunus* salvatges o naturalitzades, tenen un rang climàtic més ampli, encara que l'apetència de *C. pruni* no és la mateixa per a totes les espècies del gènere, essent *P. spinosa* i *P. cerasifera* els hostes preferits, mentre que *P. dulcis* i *P. avium* pràcticament no tenen capacitat de cria (Carraro *et al.*, 2002; Labonne i Lichou 2004).

En aquesta Tesi Doctoral s'ha identificat per primera vegada a *P. mahaleb* com a bon hoste per al fitoplasma i el vector, capacitat que probablement estigui lligada a les poblacions locals de tots dos (Sabaté *et al.* 2015). Això ho corrobora l'existència de diferents biotipus de *C. pruni* sense pràcticament heterozigots, que semblen respondre a una especificitat per les diferents espècies hostes (Peccoud *et al.*, 2013). També hi podria ajudar el fet, conegut pels agricultors, que la població local de *P. mahaleb* del Baix Llobregat procedeixi de patrons de cirerer naturalitzats, i per tant, sotmesos a selecció i multiplicació clonal. No es pot descartar tampoc, que en aquests processos de selecció fins i tot s'hi haguessin produït hibridacions amb espècies de *Prunus* més habituals per a *C. pruni*.

La major diversitat en espècies del gènere *Prunus* també propicia que hi hagi una gran diferència de susceptibilitats, i per tant, espècies molt més afectades que d'altres amb la mateixa pressió infectiva, com es pot observar al Baix Llobregat. També es compta amb

més varietat de material vegetal tolerant per a l'obtenció de varietats i patrons amb millor comportament. El fet que hi hagi espècies infectades que no mostren cap símptoma dels associats a fitoplasmes com *P. spinosa* i *P. cerasifera*, té una gran importància en el cicle, ja que permet als reservoris d'inòcul passar desapercebuts i multiplicar millor el fitoplasma i el vector (Thebaud *et al.*, 2006). Aquest paper també el poden adoptar arbres conreats tolerants, com s'ha comprovat al Baix Llobregat en mirabolà (*P. cerasifera*) i pruneres europees (*P. domestica*) altament infectats sense mostrar cap símptoma i en plena producció (Torres *et al.*, 2011). Fins al moment, les captures de *C. pruni* a la part central d'aquestes plantacions infectades han estat mínimes, tot i ser el mirabolà un dels seus hostes preferits, indicant que no hi prolifera. Tampoc no s'han observat nimfes, ni s'ha capturat cap individu per colpeig dels arbres. Això pot ser degut molt probablement als tractaments insecticides utilitzats contra diverses plagues a la primavera. Aquest fet, ajuda també a explicar perquè la prevalença de 'Ca P. prunorum' a les diferents zones ve molt marcada per la presència d'hostes salvatges.

Com Thebaud *et al.*, (2009) han determinat, els hostes hivernals obligats comuns per a *C. pruni*, *C. picta* i *C. melanoneura*, han de ser espècies de coníferes per damunt 700 metres d'alçada, i no les de terra baixa. Aquesta podria ser una altra raó que expliqués les petites poblacions de *C. pruni* i les baixes incidències d'algunes zones, ja que malgrat són insectes molt mòbils, és probable que no tinguin capacitat per a desplaçar-se més enllà de 50 quilometres, fins i tot amb l'ajuda dels vents dominants. Aquestes zones, coincideixen amb les planes continentals i costaneres allunyades de muntanyes (costa de València, vall interior de l'Ebre i Vegas Bajas del Guadiana) on tampoc hi ha *Prunus* salvatges, a banda dels ametllers bords. Les zones amb incidències i captures altes, i dispersió activa de la malaltia (Baix Llobregat, Ribera d'Ebre i Vegas Altas del Guadiana), també són més properes a muntanyes amb *Prunus* salvatges i coníferes adequades.

A les zones sense massa dispersió 'Ca P. prunorum' i amb poc risc, cal estar alerta per l'aparició de símptomes i canvis en els cicles patològics, fent prospeccions d'afectació i vectors, ja que canvis com l'augment dels cultius ecològics, podrien afavorir la cria dels

insectes. En zones on hi ha una dispersió important de la malaltia, les estratègies a seguir haurien de ser de convivència i minimització de pèrdues econòmiques. Com han proposat Jarausch *et al.* (2001a), a les zones on hi ha dispersió activa de ‘*Ca. P. prunorum*’ caldria no plantar espècies sensibles, principalment prunera japonesa i albercoquer. També seria recomanable arrencar conreus abandonats i arbres naturalitzats infectats als voltants de les plantacions. Els tractaments amb insecticides de contacte poden tenir una certa eficàcia en plantacions joves si se sincronitzen amb un seguiment del vector.

En el cas de ‘*Ca. P. mali*’ en zones atlàntiques, la primera mesura de control hauria de ser la multiplicació de material vegetal sa, ja que els resultats obtinguts semblen indicar que s’estan multiplicant plantes mare de varietats autòctones per a sidra infectades. Igual que per a *C. pruni*, la mobilitat de *C. picta* i la seva eficiència de transmissió, fan els tractaments insecticides només siguin efectius molt puntualment. Cal dir, que per a *C. picta* s’han identificat i sintetitzat cairomones atractives que poden ser de gran utilitat un cop s’hagi implementat la seva aplicació comercial (Gross, 2011). També es poden afavorir les defenses i la recuperació “recovery” dels arbres infectats si s’eviten les reinfeccions i es practiquen podes de rejuveniment (Musetti *et al.*, 2004).

El segon tipus de cicle epidemiològic és el de ‘*Ca. P. pyri*’, l’agent causal del PD en perera i el PYLR en presseguer. Els principals hostes d’aquest fitoplasma pertanyen al gènere *Pyrus* (Seemüller i Schneider 2004). El principal insecte vector de ‘*Ca. P. pyri*’ a Europa és *C. pyri* (Carraro *et al.*, 1998b), que també constitueix una de les plagues més important del conreu. Aquesta capacitat reproductiva del vector dins les mateixes plantacions comercials, a diferència dels anteriors psíl·lids vectors, fa que el cicle patològic de ‘*Ca. P. pyri*’ presenti importants particularitats. La principal font d’inòcul són les mateixes plantacions comercials, ja que gairebé totes estan infectades i els arbres de perer naturalitzats o salvatges només tenen un paper de reservori del fitoplasma a llarg termini (García-Chapa, *et al.*, 2005). Com que *C. pyri* es multiplica molt més ràpidament que els anteriors psíl·lids, i a més dins les plantacions, la pressió infectiva pel nombre de picades serà més gran. En canvi, segons els resultats obtinguts per

(García-Chapa *et al.*, 2005), aquest insecte presenta una taxa d'infecció i d'eficiència de transmissió més baixes, ja que al viure menys temps no completa sempre el període de latència.

En el cas del cicle de PYLR a Europa, encara en estudi, res no fa pensar que '*Ca. P. pyri*' tingui un cicle especial en el nou hoste ni que sigui diferent al de PYLR a l'Amèrica del Nord. La principal diferència seria l'espècie vectora concreta, *C. pyricola* a Amèrica i *C. pyri* a Europa, però aquesta diferència és comuna també en el Pear Decline (Carraro *et al.*, 1998b). Com han determinat Blomquist i Kirkpatrick (2002) les infeccions de '*Ca. P. pyri*' en presseguer a Amèrica, estan molt lligades a la presència de plantacions de perer veïnes infectades, essent el presseguer un hoste cul de sac. No es pot descartar que hi hagi transmissions secundàries entre presseguers mitjançant altres psíl·lids o cicadel·lids específics del presseguer.

El tercer tipus de cicle patològic és el de '*Ca. P. solani*' en vinya, causant de la malaltia del "Bois Noir". '*Ca. P. solani*' és un fitoplasma gens restringit en quant a famílies i espècies vegetals d'hostes. Això dona una idea de l'ampli rang de reservoris salvatges del patogen i de la seva adaptabilitat a nous cicles patològics. El seu principal vector, el cíxid *Hyalesthes obsoletus*, és un insecte extremadament polífag com a adult, transmetent la malaltia a moltes espècies diferents (Maixner, 2011). Langer i Maixner (2004) han provat l'existència de diferents cicles de l'insecte diversos hostes primaris, que corresponen a cicles patològics relativament independents. També ha determinat l'existència de soques de '*Ca. P. solani*' específiques en cada cicle. Aquesta especificitat també es reflexa en les poblacions del mateix vector *H. obsoletus*, que també semblen ser específiques en l'hoste (Maixner *et al.*, 2009).

El fet que el vector tingui una sola generació l'any, condiciona unes taxes d'infecció i eficiència de transmissió molt altes, com en el cas de la vinya, on malgrat alimentar-se puntualment transmet la malaltia. Així ho confirmen les poques captures a les capçades de vinyes amb incidències elevades i poblacions importants del vector a les males herbes. Els resultats obtinguts mostren que el vector adult comença el seu vol a mig maig a les localitzacions més càlides, i l'acaba a finals de juliol a les més fredes, volant

aproximadament un més. Aquest és el període de màxim risc d'infecció pel conreu. Pel que fa al cicles, els resultats mostren que el principal reservori al nostre país és *C. arvensis*, ja que *U. dioica*, pels seus requeriments d'humitat és molt escassa prop dels conreus de vinya. Mitjançant l'anàlisi del gen *Tuf* (Langer i Maixner, 2004) s'ha corroborat aquest fet, ja que la immensa majoria de les mostres han mostrat el perfil *Tuf-b*, lligat a *C. arvensis* (Sabaté *et al.*, 2014a).

Només les plantes de vinya de La Rioja i Navarra han estat positives a la soca *Tuf-a* (*U. dioica*), però els insectes i les males herbes d'aquestes parcel·les estaven infectades per la soca *Tuf-b*, quedant així incògnites per aclarir. Pel que fa a la caracterització d'aïllats del gen *Vmp-1* (Pacífico *et al.*, 2009), s'han obtingut 4 aïllats diferents, V1, V2, V3 i V15. L'aïllat V1 és el majoritari en vinyes, *H. obsoletus* i *C. arvensis* a totes les zones excepte a La Rioja alta on en vinya ho és el V3 associat a *Tuf-a*. L'aïllat V4 s'ha trobat només en dos *H. obsoletus* capturats a la Terra Alta, essent possible que formin cicles patològics naturals i independents de les vinyes i de *C. arvensis*. També s'ha observat que vinyes severament afectades han disminuït els símptomes, arribant fins i tot a recuperar la producció normal, confirmant així el "recovery" observat a d'altres parts d'Europa (Romanazzi *et al.*, 2013).

Amb els resultats obtinguts, queda clar que 'Ca. P. solani' és un fitoplasma amb cicles variables, gran capacitat d'adaptació i que es troba àmpliament distribuït en el medi natural, moltes vegades passant desapercebut. Qualsevol estratègia de lluita i previsió de danys ha de tenir en compte aquests fets i preveure aquestes noves adaptacions. Segons Maixner *et al.*, (2009) i els resultats d'aquest treball, queda clar que el control de *C. arvensis* i *U. dioica* serà la millor eina per a evitar la dispersió de la malaltia, ja que es controla la font d'inòcul i el vector a la vegada. Cal tenir en compte que el control de *C. arvensis* és complicat, donades les seves estructures de resistència subterrànies, la capacitat d'enfilar-se pels tutors de les vinyes i la seva resistència a molts herbicides. A més, no només és present a l'interior de les vinyes, sinó que segons observacions personals, és molt comú a les vores dels camins i espais oberts sense conreu, essent aquestes comunitats, les que per la seva longevitat solen estar més infectades i tenen més capacitat de cria de *H. obsoletus*.

Maixner (2011) presenta l'aplicació d'insecticides sobre les vinyes com a poc efectiva, ja que l'insecte en prou feines roman al conreu, i abans de morir tindria temps d'infectar un bon nombre de plantes. Probablement l'aplicació d'insecticides fortament sistèmics que arribin a les nimfes de les arrels dels *C. arvensis* o *U. dioica* si que podria ser efectiva. Actualment, Mazzoni *et al.* (2010) treballen en dificultar l'aparellament de *H. obsoletus*, amb el que es coneix com a disrupció de l'acoblament, emetent sons semblants als de competició entre mascles, per bé que la implementació efectiva en camp encara s'està posant a punt.

Amb tot això es poden entreveure els futurs problemes i amenaces. Per a '*Ca. P. mali*', l'adaptació dels seus vectors al conreu de pomera, n'augmentaria la zona de distribució, incloent-hi les produccions mediterrànies lliures fins ara de la malaltia. El principal risc futur respecte '*Ca. P. prunorum*' també es l'augment de la seva àrea de distribució per l'adaptació de *C. pruni* a hostes molt abundants com l'ametller o el presseguer. A més, el presseguer també està amenaçat per una nova malaltia molt greu com el PYLR, que caldrà seguir-ne l'expansió i determinar-ne exactament el cicle. Pel que fa a la vinya, s'ha de continuar lluitant per evitar l'entrada de '*Ca. P. vitis*' des del Rosselló, però estar també atents a l'expansió dels focus de Portugal, donat que el vector ja està àmpliament distribuït. També s'ha de seguir amb molta atenció la possible expansió de la soca virulenta *Tuf-a* de '*Ca. P. solani*' present en vinyes de La Rioja i Navarra. I finalment, cal estar sempre alerta per l'entrada de fitoplasmes i vectors al·lòctons que podrien causar noves malalties o augmentar la dispersió i virulència de les presents.

VI CONCLUSIONS

1. Els quatre fitoplasmes estudiats estan distribuïts a gairebé totes les zones avaluades, produint pèrdues destacables i representant una seriosa amenaça per als conreus dels fruiters i la vinya en el futur.
2. S'ha determinat la presència dels principals vectors d'aquests fitoplasmes a les zones afectades, confirmant així per a la Península Ibèrica als insectes transmissors a la resta d'Europa.
3. *Prunus salicina* (prunera japonesa) és el conreu més afectat per 'Ca. P. prunorum', seguit de *P. armeniaca* (albercoquer) i en menor mesura, depenent de la zona de *P. persica* (presseguer).
4. *Prunus cerasifera* (mirabolà) i *P. domestica* (prunera europea), malgrat tenir taxes d'infecció elevades, són pràcticament asimptomàtics. No s'ha detectat el fitoplasma en *P. dulcis* (ametller) i *P. avium* (cirerer).
5. *Prunus mahaleb* (cirerer de santa llúcia) s'ha revelat per primera vegada com a hoste del fitoplasma i del vector *C. pruni*, presentant un paper clau en el cicle patològic a la zona del Baix Llobregat.
6. S'ha determinat l'existència de dues pautes epidemiològiques per a 'Ca. P. prunorum', relacionades amb altes o baixes incidència i dispersió. Aquestes pautes van estretament lligades als nivells poblacionals del vector, i a l'abundància d'hostes salvatges del vector i el fitoplasma.
7. S'han proposat estratègies de control i recomanacions per a minimitzar la dispersió i els danys per a 'Ca. P. prunorum', 'Ca. P. mali', 'Ca. P. pyri', i 'Ca. P. solani'.

8. 'Ca. P. mali' està àmpliament distribuït amb incidències elevades a les plantacions de pomera de la Cornisa cantàbrica. No s'ha detectat aquest fitoplasma a les plantacions de pomera per al consum en fresc intensives de Catalunya.
9. S'ha identificat per primera vegada *Cacopsylla picta*, vector principal de 'Ca. P. mali', en parcel·les afectades per la malaltia del País Basc i Astúries. No s'ha identificat aquest vector a Catalunya.
10. S'ha identificat *C. melanoneura*, vector puntual de 'Ca. P. mali', en plantacions de pomera a totes les zones estudiades, però només en poblacions estables a Astúries.
11. S'ha detectat 'Ca. P. mali' en *C. picta* al País Basc i Astúries, i en *C. melanoneura* només a Astúries.
12. S'ha identificat i caracteritzat per primera vegada a Europa a 'Ca. P. pyri' causant un brot important de PYLR en presseguer.
13. S'ha determinat genèticament el seu origen autòcton, mitjançant la seqüenciació de gens ribosòmics i de proteïnes de membrana. L'aïllat caracteritzat presenta la màxima similitud amb aïllats europeus i de la Conca mediterrània.
14. 'Ca. P. solani' és present causant "Bois noir" a tota la vall de l'Ebre i Catalunya, però amb incidències variables.
15. Les varietats de vinya més afectades per 'Ca. P. solani' han estat Chardonnay i Garnatxa.
16. *Hyalesthes obsoletus* es troba present a totes les regions estudiades i amb poblacions més elevades a les parcel·les amb més incidència.

17. S'ha identificat *Convolvulus arvensis* com a l'hoste alternatiu de la malaltia més abundant a les vinyes, i s'ha comprovat la seva capacitat de cria del vector.
18. S'ha determinat l'aïllat *Tuf-b*, associat a *C. arvensis*, com a majoritari en la vinya, el vector i les males herbes. L'aïllat virulent *Tuf-a* associat a *U. dioica*, només ha estat detectat en plantes de vinya de La Rioja i Navarra.
19. L'amplia distribució geogràfica de '*Ca. P. solani*', i la seva multiplicitat de cicles i hostes salvatges, obliguen a la convivència amb el patogen i a implementar estratègies de control i minimització de danys en consonància.

VII REFERÈNCIES

- Agrios, G.N. 2013. Patología Vegetal. Ed. Limusa. 838 pp.
- Angelini, E., Clair D., Borgo, M., Bertaccini A., Boudon-Padieu, E. 2001. Flavescence dorée in France and Italy. Occurrence of closely related phytoplasma isolates and their near relationships to Palatinate grapevine yellows and an Alder yellows phytoplasma. *Vitis* 40(2): 79-86.
- Anthos (Sistema de información sobre las plantas de España). www.anthos.es.
- Arnaud, G., Malembic-Maher, S., Salar, P., Bonnet, P., Maixner, M., Marcone, C., Boudon-Padieu, E., Foissac X. 2007. Multilocus sequence typing confirms the close genetic interrelatedness of three distinct flavescence dorée phytoplasma strain clusters and group 16SrV phytoplasmas infecting grapevine and alder in Europe. *Applied and Environmental Microbiology* 73:4001-4010.
- Arora, Y.K., Sinha, R.C. 1988. Plant pathogenic mycoplasmas: Morfological and Biochemical characteristics. *Mycoplasma diseases of crops*. Ed. Springer. 390 pp.
- Artigues, M., Avilla, J., Jauset, A.M., Sarasúa, M.J. 1995. Predators of *Cacopsylla pyri* in NE Spain. Heteroptera: Anthocoridae and Miridae. *Bull IOBC/WPRS*. 19(4): 231-235.
- Atger, P. 1982. Le psylle du poirer. INRA-CTIFL. 68 pp.
- Avilla, J., Miarnau, X., Rodríguez, M., Bosch, D., Artigues, M., Sarasúa, M.J. 2005. Resistencia de *Cydia pomonella* (L.)(Lepidoptera: Tortricidae) y de *Cacopsylla pyri* (L.)(Hemiptera: Psyllidae) a insecticidas. *Phytoma España* 173: 79-85.
- Avinent, L., Llácer, G., Almacellas, J., Torà, R. 1997. Pear decline in Spain. *Plant Pathology* 46: 694-698.
- Baldini, E. 1992. *Arboricultura General*. Ed. Mundi-Prensa. 381 pp.

- Baric, S., Öttl, S., Dalla via, J. 2010. Infection rates of natural psyllid populations with 'Candidatus Phytoplasma mali' in South Tyrol (Northern Italy). *Julius-Khün-Archiv* 427: 189-192.
- Battle, A., Lavina, A., Kuszala, C., Clair, D., Larrue, J., Boudon-Padieu, E. 1997. Detection of flavescence dorée phytoplasma in grapevine in northern Spain. *Vitis* 36(4): 211-212.
- Battle, A., Martínez, M.A., Laviña, A. 2000. Occurrence, distribution and epidemiology of grapevine yellows in Spain. *European Journal of Plant Pathology* 106: 811–816.
- Battle, A., Altabella, N., Sabaté, J., Laviña, A. 2008. Study of the transmission of Stolbur Phytoplasma to different crop species, by *Macrostelus quadripunctulatus* (Kirschbaum). *Annals of Applied Biology* 152: 235-242.
- Battle, A., Sabaté, J., Iglesias, I., Laviña, A. 2012. Identification and Epidemiology of 'Candidatus phytoplasma prunorum' in Spanish peach orchards. Susceptibility of different rootstocks to the disease. *Acta Horticulturae* 962: 443-447.
- Bekele, B., Hodgetts, J., Tomlinson J., Boonham, J., Nikolic´ P., Swarbrick, P., Dickinson, B. 2011. Use of a real-time LAMP isothermal assay for detecting 16SrII and XII phytoplasmas in fruit and weeds of the Ethiopian Rift Valley. *Plant Pathology* 60: 345–355.
- Bertaccini, A., Duduk, B. 2009. Phytoplasma and phytoplasma diseases: a review of recent research. *Phytopathologia Mediterranea* 48: 355-378.
- Bertolini, E., Torres, E., Olmos, A., Martín, M.P., Bertaccini, A., Cambra, M. 2007. Co-operational PCR coupled with Dot Blot hybridization for detection and 16SrX grouping phytoplasmas. *Plant Pathology* 56: 677-682.

- Blomquist, C. L., Kirkpatrick, B. C. 2002. Identification of phytoplasma taxa and insect vectors in Peach yellow leaf disease in California. *Plant Disease* 86: 759-763.
- Borroto-Fernandez, E.G., Calari, A., Hanzer, V., Katinger, H., Bertaccini, A., Laimer, M. 2007. Phytoplasma infected plants in Austrian forests: role as a reservoir. *Bulletin of Insectology* 60 (2): 391-392.
- Boudon-Padieu, E, Maixner, M. 1998. Jaunisses de la Vigne : état des connaissances et des méthodes de lutte / Grapevine Yellows: current knowledge and control methods. *Bulletin de l'Office International de laVigne et du Vin (O.I.V.)* 71(809-810): 572-607.
- Bressan, A., Turata, R., Maixner, M., Spiazzi, S., Boudon-Padieu, E., Girolami, V. 2007. Vector activity of *Hyalesthes obsoletus* living on neetles and transmitting a stolbur phtyoplasma to grapevines: a case study. *Annals of applied Biology* 150: 331-339.
- Canik, D., Ertunc, F. 2007. Distribution and molecular characterization of Apple Proliferation phytoplasma in Turkey. *Bulletin of insectology* 60(2): 335-336.
- Carraro, L., Osler, R., Loi, N., Ermacora, P., Refatti, E. 1998a. Transmission of European Stone Fruit yellows phytoplasma by *Cacopsylla pruni*. *Journal of Plant Pathology* 80: 233-239.
- Carraro, L., Loi, N., Ermacora, P., Gregoris, A., Osler, R. 1998b. Transmission of pear decline by using naturally infected *Cacopsylla pyri*. *Acta Horticulturae* 472: 665-668.
- Carraro, L., Loi, N., Ermacora, P. 2001. Transmission characteristics of the European stone fruit yellows phytoplasma and its vector *Cacopsylla pruni*. *European Journal of Plant Pathology* 107(7): 695-700.

- Carraro, L., Ferrini, F., Ermacora, P., Loi, N. 2002. Role of wild *Prunus* species in the epidemiology of European stone fruit yellows. *Plant Pathology* 51: 513-517.
- Carraro, L., Ferrini, F., Ermacora, P., Loi, N. 2004. Transmission of European stone fruit yellows phytoplasma to *Prunus* species by using vector and graft transmission. *Acta Horticulturae* 657: 449-453.
- Carraro, L., Ferrini, F., Martini, N., Ermacora, P., Loi, N. 2008. A serious epidemic of Stolbur on celery. *Journal of Plant Pathology* 90(1): 131-135.
- Caudwell, A. 1961. Etude sur la maladie du Bois Noir de la vigne : ses rapports avec la Flavescence dorée. *Annales des epiphytes* 12: 141-262.
- Caudwell, A., Boudon-Padieu, E., Kuzsala, C., Larrue, J. 1987. Biologie et étiologie de la flavescence dorée. Recherches sur son diagnostic et sur les méthodes de lutte. *Atti del Convegno sulla flavescenza dorata delle vite Vicenza-Verona (1987)*: 175-203.
- Chabrolin, C. 1924. Quelques maladies des arbres fruitiers de la Vallée du Rhône. *Annales Epiphytes* 10: 265-333.
- Christensen, N.M., Nyskjold, H., Nicolaisen, M. 2013. Real-time PCR for universal phytoplasma detection and quantification. *Methods in Molecular Biology* 938: 245-52.
- Chuche, J., Thiéry, D. 2014. Biology and ecology of the Flavescence doreé vector *Scaphoideus titanus*: a review. *Agronomical Sustainable Development* 34: 381–403.
- Ciccotti, A.M., Bianchedi, P.L., Bragagna, P., Deromedi, M., Filippi, M., Forno, F., Mattedi, L. 2007. Transmission of ‘*Candidatus* Phytoplasma mali’ by root bridges. *Bulletin of Insectology* 60 (2): 387-388.

- Cieslinska, M. 2011a. European stone fruit yellows disease and its causal agent ‘*Candidatus Phytoplasma prunorum*’. *Journal of Plant Protection Research* 51: 441-447.
- Cieslinska, M. 2011b. Less common phytoplasmas infecting stone fruit trees. *Journal of Plant Protection Research* 51: 435-440.
- Cimerman, A., Pacifico, D., Salar, P., Marzachi, C., & Foissac, X. 2009. Striking diversity of *vmp1*, a variable gene encoding a putative membrane protein of the stolbur phytoplasma. *Applied Environmental Microbiology* 75: 2951–2957.
- Contaldo, N., Bertaccini, S., Palmintieri, S., Windsor H.M., Windsor, G.D. 2012. Axenic culture of plant pathogenic phytoplasmas. *Phytopathologia Mediterranea* 51(3): 607–617.
- Danet, J.L., Balakishiyeva, G., Cimerman, A., Sauvion, N., Marie-Jeanne, V., Labonne, G., Laviña, A., Batlle, A., Krizanac, I., Skoric, D., Ermacora, P., Serçe, C.U., Çaglayan, K., Jarausch, W., Foissac, X. 2011. Multilocus sequence analysis reveals the genetic diversity of European fruit tree phytoplasmas and supports the existence of inter-species recombination. 2011. *Microbiology* 157: 438- 450.
- Davies, D.L., Guise, C.M., Adams, A.N. 1992. Parry’s disease of pears is similar to pear decline and is associated with mycoplasmas like organisms transmitted by *Cacopsylla pyricola*. *Plant Pathology* 41: 195-203.
- Deng, S., Hiruki, C. 1991. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and non-culturable mollicutes. *Journal of Microbiological Methods* 14: 53–61.
- Duduk, B., Bertaccini A. 2011. Phytoplasma classification: Taxonomy based on 16S ribosomal gene, is it enough?. *Phytopathogenic Mollicutes* 1(1): 3-13.

- ESYRCE (Encuesta sobre superficies y rendimientos de cultivos de España). 2014. <http://www.magrama.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/agricultura/esyrce/>.
- EPPO (European and Mediterranean plant protection organization). www.eppo.int.
- FEPEX (Federación española de asociaciones de productores exportadores de frutas, hortalizas, flores y plantas vivas). 2014. <http://www.fepex.es/datos-del-sector/exportacion-importacion-esp%C3%B1ola-frutas-hortalizas>.
- Filippin, L., Jovic, J., Cvrkovic, T., Forte, V., Clair, D., Tosevski, I., Boudon-Padieu, E., Borgo, M., Angelini, E. 2009. Molecular characteristics of phytoplasmas associated with Flavescence dorée in clematis and grapevine and preliminary results on the role of *Dictyophara europaea* as a vector. *Plant Pathology* 58: 826–837.
- Fletcher, J., Wayadande, A., Melcher, U., Ye, F. 1998. The phytopathogenic mollicute-insect vector interface: a closer look. *Phytopathology* 88:1351-1358.
- Fletcher, J. 1999. Interactions of phytopathogenic mollicutes with insects and plant hosts. www.uniud.it/phytoplasma/conf.html.
- Frisinghelli, C., Delaiti, L., Grando, M.S., Forti, D., Vindimian, M.E. 2000. *Cacopsylla costalis* (Flor, 1861), as a vector of apple proliferation in Trentino. *Journal of Phytopathology* 148: 425-431.
- García-Chapa, M., Medina, V., Viruel, M.A., Laviña, A, Batlle, A. 2003. Seasonal detection of Pear decline Phytoplasma by nested-PCR in different pear cultivars. *Plant Pathology* 52: 513-520.
- García-Chapa, M., Sabaté, J., Laviña, A. Batlle, A. 2005. Role of *C. pyri* in the epidemiology of pear decline in Spain. *European Journal of Plant Pathology* 111: 9-17.

- Gibb, K. 1999. New phytoplasma-plant associations. www.uniud.it/phytoplasma.
- Giunchedi, L., Poggi-Pollini, C., Credi, R. 1982. Susceptibility of stone fruit trees to the Japanese plum-tree decline causal agent. *Acta Horticulturae* 130: 285-290.
- Goidanich, G. 1933. Un deperimento dei susini. *Bolletino Regia Stazione Patologia Vegetale Roma* 13: 160-173.
- Gross, J. 2011. Chemical ecology of psyllids and their interactions with vectored phytoplasma and plants. *IOBC/wprs Bulletin* 72: 23-126.
- Hibino, H., Kaloostian, G.H., Schneider, H. 1971. Mycoplasma-like bodies in the pear psylla vector of pear decline. *Virology* 43: 34-40.
- Hodgetts, J., Boonham, N., Mumford, R., Dickinson, M. 2009. Panel of 23S rRNA Gene-Based Real-Time PCR Assays for Improved Universal and Group-Specific Detection of Phytoplasmas. *Applied Environmental Microbiology* 75 (9).
- Hodkinson I.D., White I.M. 1979. Homoptera. Psylloidea. Royal Entomological Society of London. 99 pp.
- Hoshi, A., Ishii, Y., Kakizawa, S., Oshima, K., Namba, S. 2007. Host-parasite interaction of phytoplasmas from a molecular biological perspective. *Bulletin of insectology* 60(2): 105-107.
- IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team–Phytoplasma taxonomy group. 2004. ‘*Candidatus*Phytoplasma’, a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *International Journal of Systematic Evolution Microbiology* 54: 1243–1255.
- Jarausch, B., Schwind, N., Jarausch, W., Krczal, G., Dickler, E., Seemüller, E. 2003. First report of *Cacopsylla picta* as a vector of apple proliferation phytoplasma in Germany. *Plant disease* 87:101.

- Jarausch, B., Mühlenz, I., Beck, A., Lampe, I., Harzer, U., Jarausch, W. 2008. Epidemiology of European Stone fruit yellows in Germany. *Acta Horticulturae* 781: 417-422.
- Jarausch, B., Schwind, N., Fuchs, A., Jarausch, W. 2011. Characteristics of the spread of apple proliferation by its vector *Cacopsylla picta*. *Phytopathology* 101: 1471-1480.
- Jarausch, W., Eyquard, J.P., Mazy, K., Lansac, M., Dosba, F. 1999. High level of resistance of savage cherry (*Prunus Avium L.*) towards European Stone Fruit Yellows phytoplasma. *Advanced Horticultural Science* 13: 108-112.
- Jarausch, W., Eyquard, J.P., Lansac, M., Mohns, M., Dosba, F. 2000. Susceptibility and tolerance of new French *Prunus domestica* cultivars to European stone fruit yellows phytoplasma. *Journal of Phytopathology* 148: 489-493.
- Jarausch, W., Danet, J.L., Labonne, G., Dosba, F., Broquaire, J.M., Saillard, C., Garnier, M. 2001a. Mapping the spread of apricot chlorotic leaf roll (ACLR) in southern France and implication of *Cacopsylla pruni* as a vector of European stone fruit yellows (ESFY) phytoplasmas. *Plant Pathology* 50: 782-790.
- Jarausch, W., Jarausch-Wehrheim, B., Danet, J.L., Broquaire, J.M., Dosba, F., Saillard, C., Garnier, M. 2001b. Detection and identification of European stone fruit yellows and other phytoplasmas in wild plants in the surroundings of apricot chlorotic leaf roll-affected orchards in southern France. *European Journal of Plant Pathology* 107: 209- 217.
- Jauset, A. M., Artigues, M., Avilla, J., Sarasúa, M.J. 2000. Relación *Cacopsylla pyri* (L.) (Homoptera: Psyllidae) - Peral. Influencia de la variedad. *Boletín Sanidad Vegetal Plagas* 26: 657-664.

- John, E., Maliyakal, J. 1992. An efficient method for isolation of RNA and DNA from plants containing polyphenolics. *Nucleic Acid Research* 20: 2381- 2384.
- Kaminska, M., Sliwa, H. 2004. First report of phytoplasma belonging to apple proliferation group in roses in Poland. *Plant Disease* 88: 1283.
- Kison, H., Kirckpatrick, B. C., Seemüller E. 1997. Genetic comparisons of the peach yellow leaf roll agent with European fruit tree phytoplasmas of the apple proliferation group. *Plant Pathology* 46: 538-544.
- Kison, H., Seemüller, E. 2001. Differences in strain virulence of the European Stone Fruit Yellows phytoplasma and susceptibility of stone fruit trees on various rootstocks to this pathogen. *Journal of Phytopathology* 149: 533-541.
- Kube, M., Schneider, B., Kuhl, H., Dandekar, T., Heitmann, K., Migdoll, A.M., Reinhardt, R., Seemüller, E. 2008. The linear chromosome of the plant pathogenic mycoplasma '*Candidatus Phytoplasma mali*'. *BMC Genomics* 9: 306.
- Kube, M., Mitrovic, J., Duduk, B., Rabus, R., Seemüller, E. 2012. Current view on phytoplasma genomes and encoded metabolism. *The scientific world journal* 2012: 185942.
- Labonne, G., Lichou, J. 2004. Data on the life cycle of *Cacopsylla pruni*, *Psyllidae* vector of European Stone fruit yellows (ESFY) phytoplasma, in France. *Acta Horticulturae* 657: 465-470.
- Langer, M., Maixner, M. 2004. Molecular characterization of grapevine yellows associated phytoplasmas of the stolbur-group based on RFLP-analysis of non-ribosomal DNA. *Vitis* 43 (4) : 191-199.
- Laviña, A., Batlle, A., Larrue, J., Daire, X., Clair, D., Boudon-Padieu, E. 1995. First report of grapevine bois noir phytoplasma in Spain. *Plant Disease* 79: 1075.

- Laviña, A., Sabaté, J., García-Chapa, M., Torres, E., Batlle, A. 2004. Occurrence and Epidemiology of European Stone Fruit Yellows Phytoplasmas in Spain. *Acta Horticulturae* 657: 489-494.
- Laviña, A., Sabaté, J., Batlle, A. 2011. '*Candidatus* Phytoplasma mali': identification of potential insect vectors in Spanish apple orchards. *Bulletin of Insectology* 64: 125-126.
- Lee, I.M., Gundersen, E., Hammond, R.W., 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: 559-565.
- Lee, I.M., Gundersen, D.E. 2000. Phytoplasma: Phytopathogenic Mollicutes. *Annual Review of Microbiology* 54: 221-255.
- Lederer, W., Seemüller, E. 1992. Demonstration of mycoplasmas in *Prunus* species in Germany. *Journal of Phytopathology* 134: 89-96.
- Lessio, M., Tedeschi, R., Alma, A. 2007. Population dynamics, host plants and infection rate with stolbur phytoplasma of *Hyalesthes obsoletus* Signoret in North-Western Italy. *Journal of Plant Pathology* 89 (1): 97-102.
- Llácer, G., Medina, V., Archelos, D. 1986. Investigaciones sobre la detección, difusión natural y control del enrollamiento clorótico del albaricoquero. *Boletín Sanidad Vegetal de Plagas* 12:181-207.
- Llácer, G. 1999. Importancia de los factores sanitarios en la producción de plantas frutales de calidad. Situación actual de las principales patologías (virus y fitoplasmosis) de difícil erradicación asociadas a los frutales. *Phytoma España* 114: 20-27.

- Lorenz, K.H., Dosba, F., Poggi-Pollini, C., Llácer, G., Seemüller, E. 1994. Phytoplasma diseases of *Prunus* species in Europe are caused by genetically similar organisms. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 101: 567-575.
- 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: 771–776.
- Maixner, M. 1994. Research note: transmission of German grapevine yellows (Vergilbungskrankheit) by the planthopper *Hyalesthes obsoletus* (Auchenorrhyncha: Cixiidae). *Vitis* 33: 103–104.
- Maixner, M., Ahrens, U. & Seemüller, E. 1995. Detection of the german grapevine yellows (vergilbungskrankheit) MLO in grapevine, alternative hosts and a vector by a specific PCR procedure. *European Journal Plant Pathology* 101: 241-250.
- Maixner, M., Johannesen, J., Seitz, A. 2009. Aspects of the interaction of stolbur phytoplasma, vectors and host plants in the two epidemic systems of Bois Noir. *Progres Agricole et Viticole*: 141-142.
- Maixner, M. 2011. Recent advances in Bois noir research. *Petria* 21: 95-108.
- Malagnini, V., Pedrazzoli, F., Papetti, C., Cainelli, C., Zasso, R., Gualandri, V., Pozzebon, A., Ioriatti, C. 2013. Ecological and genetic differences between *Cacopsylla melanoneura* (Hemiptera, Psyllidae) populations reveal species host plant preference. *PLoS ONE* 8(7): e69663. doi: 10.1371/journal.pone.0069663.
- Marcone, C., Jarausch, B., Jarausch, W. 2010. ‘*Candidatus* Phytoplasma prunorum’, the causal agent of European stone fruit yellows, an overview. *Journal of Plant Pathology* 92(1): 19-34.

- Mattedi, L., Forno, F., Cainelli, C., Grando, M.S., Jarausch, W. 2008. Research on ‘*Candidatus Phytoplasma mali*’ transmission by insect vectors in Trentino. *Acta Horticulturae* 781: 369-374.
- Mayer, C.J., Jarausch, B., Jarausch, W., Jelkmann, W., Vilcinskas, A., Gross J. 2009. *Cacopsylla melanoneura* has no relevance as vector of apple proliferation in Germany. *Phytopathology* 99(6): 729-738.
- Mayer, C.J., Vilcinskas, A., Gross, J. 2011. Chemically mediated multitrophic interactions in a plant-insect vector-phytoplasma system compared with a partially non-vector species. *Agricultural and forest entomology* 13: 25-35.
- Mazzoni, V., Lucchi, A., Ioratti, C., Virant-Doberlet, M., Anfora, G. 2010. Matting behavior of *Hyalesthes obsoletus* (Hemiptera: Cixiidae). *Annals of the Entomological Society of America* 103(5): 813-822.
- Mori, N., Pavan, F., Bondavalli, R., Reggiani, N., Paltrinieri, S., Bertaccini, A. 2007. Factors affecting the spread of “bois noir” disease in grapevine cv. Lambrusco in northern Italy. *Bulletin of Insectology* 60: 295-296.
- Morvan, G. 1977. Apricot chlorothic leaf roll. *OEPP/EPPO Bulletin* 7: 37-55.
- Murolo, S., Marcone, C., Prota, V., Garau, R., Foissac, X., Romanazzi, G. 2010. Genetic variability of the stolbur phytoplasma *vmp1* gene in grapevines, bindweeds and vegetables. *Journal of Applied Microbiology* 109(6) : 2049-2059.
- Musetti, R., Sanita di Toppi, L., Ermacora, P., Favali, M. 2004. Recovery in apple trees infected with the apple proliferation phytoplasma: an ultrastructural and biochemical study. *Phytopathology* 94: 203-208.
- Nyland, G., Schlocker A. 1951. Yellow leaf roll of peach. *Plant Disease Reports* 35: 33.

- OEMV (Observatorio español del mercado del vino). 2014. <http://www.oemv.es/esp/-oemv.php>.
- Oshima, K., Maejima A., Namba, S. 2013. Genomic and evolutionary aspects of phytoplasmas. *Frontiers in Microbiology* 4: 230.
- Ossianilsson, F. 1992. The *psylloidea* (Homoptera) of Fenoskandia and Denmark. *Fauna Entomologica Scandinavica* Vol.26: 346 pp.
- Pacifico, D., Alma, A., Bagnoli, B., Foissac, X., Pasquini, G., Tessitori, M. 2009. Characterization of Bois noir isolates by restriction fragment length polymorphism of a stolbur-specific putative membrane protein gene. *Phytopathology* 99: 711–715.
- Palermo, S., Elekes, M., Botti, S., Ember, I., Alma, A., Orosz, A. 2004. Presence of stolbur phytoplasma in Cixiidae in Hungarian vineyards. *Vitis* 43: 201-203.
- Peccoud, J., Labonne, G., Sauvion, N. 2013. Molecular test to assign individuals within the *Cacopsylla pruni* complex. *PLoS ONE* 8(8): e72454. doi: 10.1371/ journal. pone. 0072454
- Pinzauti, F., Trivellone, V., Bagnoli, B. 2008. Ability of *Reptalus quinquecostatus* (Hemiptera: Cixiidae) to inoculate stolbur phytoplasma to artificial feeding medium. *Annals of Applied Biology* 153: 299–305.
- Pizzinat, A., Tedeschi, R., Alma, A. 2011. *Cacopsylla melanoneura* (Foerster): aestivation and overwintering habitats in Northwest Italy. *Bulletin of Insectology* 64: 135-136.
- Poggi-Pollini, C., Bissani, R., Giunchedi, L. 2001. Occurrence of European stone fruit phytoplasma (ESFYP) infection in peach orchards in Northern-Central Italy. *Journal of Phytopathology* 149: 725-730.

- Poggi-Pollini, C., Bissani, R., Dradi, D., Mori, N., Visgalli, T. 2004. Detection of ESFYP in homoptera insects and in wild stone fruit trees collected in peach orchards in Northern Italy. *Acta Horticulturae* 657: 513-518.
- Purcell, A. H., Nyland, G., Raju, B. C., Heringer, M. R. 1981. Peach yellow leaf roll epidemic in Northern California; effects of peach cultivar, tree age, and proximity to pear orchards. *Plant Disease* 65: 365-368.
- Q-Bank Phytoplasmas database. <http://www.q-bank.eu/Phytoplasmas/>.
- Quaglino, F., Zhao, Y., Casati, P., Bulgari, D., Bianco, P. A., Wei, W. 2013. '*Candidatus* *Phytoplasma solani*', a novel taxon associated with stolbur and bois noir related diseases of plants. *International Journal Systematic Evolutionary Microbiology* 63: 2879-2894.
- Rallo, L. 1973. Decaimiento del peral en plantaciones del Valle del Ebro. *Anales del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias, Servicio de Protección vegetal* 3: 147-205.
- Razin, S. 2007. Molecular biology and genomics of Mollicutes. *Bulletin of Insectology* 60 (2): 101-103.
- Riedle-Bauer, M., Sára, A., Regner Ferdinand. 2008. Transmission of a stolbur phytoplasma by the *Agallinae* leafhopper *Anaceratagallia ribauti* (Hemiptera, *Auchenorrhyncha*, *Cicadellidae*). *Journal of Phytopathology* 156: 687-690.
- Romanazzi, G., Murolo, S., Feliciani, E. 2013. Effects of an Innovative Strategy to Contain Grapevine Bois Noir: Field Treatment with Resistance Inducers. *Phytopatology* 103(8): 785-791.

- Rahola, J., Reyes, J., Giralt, L., Torres, E., Barrios, G. 1997. La Flavescencia dorada en viñedos del Alt Empordà (Girona). Boletín de sanidad vegetal de plagas 23: 403-416.
- Rui, D., Ciferri, R., Refatti, E. 1950. La virosi degli 'scopazzi del melo' nel Veronese. Notiziario sulle malattie delle piante 13: 7-11.
- Sabaté, J., Laviña, A., Batlle, A. 2007a. Survey of *Cacopsylla pruni* in different fruit tree producing areas of Spain. Bulletin of Insectology 60 (2): 193-194.
- Sabaté, J., Laviña, A., Legorburu, J., Fortanete, J., Pérez de Obanos, J.J., Pérez Marín, J.L. 2007b. Incidence of Bois Noir phytoplasma in different wine-growing regions of Spain and its relation to *Hyalesthes obsoletus*. Bulletin of Insectology 60(2): 367-368.
- Sabaté, J., Laviña, A., Batlle, A. 2014a. Incidence of Bois Noir phytoplasma in different viticulture regions of Spain and Stolbur isolates distribution in plants and vectors. European Journal of Plant Pathology 139: 185-193.
- Sabaté, J., Laviña, A., Batlle, A. 2014b. First report of '*Candidatus Phytoplasma pyri*' causing Peach yellow leaf roll (PYLR) in Spain. Plant Disease 98(7): 989.
- Sabaté, J., Laviña, A., Batlle, A. 2015. Incidence and distribution of '*Candidatus Phytoplasma prunorum*' and its vector *Cacopsylla pruni* in Spain: an approach to the epidemiology of the disease and the role of wild *Prunus*. Plant Pathology: In press.
- Sala, R. 1935. Vegetación invernal: en El ciruelo y su cultivo. Ed. Salvat. 206-209 pp.
- Schneider, H. 1977. Indicator hosts for pear decline: symptomatology, histopathology, and distribution of mycoplasma like organism in leaf veins. Phytopathology 67: 592-601.

- Schneider, B., Ahrens, U., Kirkpatrick, B.C., Seemüller, E. 1993. Classification of plant pathogenic mycoplasma-like organism using restriction-site analysis of PCR amplified 16S rDNA. *Journal of General Microbiology* 139: 519-527.
- Seemüller, E., Schneider, B. 2004. ‘*Candidatus Phytoplasma mali*’, ‘*Candidatus Phytoplasma pyri*’ and ‘*Candidatus Phytoplasma prunorum*’, the causal agents of apple proliferation, pear decline and European stone fruit yellows, respectively. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology* 54: 1217-1226.
- Seemüller, E., Schneider, B. 2007. Differences in virulence and genomic features of strains of ‘*Candidatus Phytoplasma mali*’, the apple proliferation agent. *Phytopathology* 97: 964-970.
- Seemüller, E., Moll, E., Schneider, B. 2008. Apple proliferation resistance of *Malus sieboldii* based rootstocks in comparison to rootstocks derived from other *Malus* species. *European Journal of Plant Pathology* 121: 109-119.
- Sforza, R., Clair, D., Daire, X., Larrue, J., Boudon-Padieu, E. 1998. The role of *Hyalesthes obsoletus* (Hemiptera:Cixiidae) in the occurrence of bois noir of grapevines in France. *Journal of Phytopathology* 146: 549-556.
- Shalla, T.A., Chiarappa, L., Carroll, T.W. 1963. A graft transmissible factor associated with pear decline. *Phytopathology* 53: 366-367.
- Smart, C. D., Schneider, B., Blomquist, 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. *Applied Environmental Microbiology* 62: 1988-1993.

- Sousa, E., Casati, P., Cardoso, F., Baltazar, C., Durante, G., Quaglino, F., Bianco P.A. 2010. Flavescence dorée phytoplasma affecting grapevine (*Vitis vinifera*) newly reported in Portugal. *Plant Pathology* 59(2): 398.
- Steffek, R., Follak, S., Sauvion, N., Labonne, G., MacLeod, A. 2012. Distribution of ‘*Candidatus Phytoplasma prunorum*’ and its vector *Cacopsylla pruni* in European fruit-growing areas: a review. *Eppo Bulletin* 42(2): 191-202.
- Sugio, A., Kingdom, H.N., MacLean, A.M., Grieve, V.M., Hogenhout, S.A. 2011. Phytoplasma protein effector SAP11 enhances insect vector reproduction by manipulating plant development and defense hormone biosynthesis. *Annual Review of Phytopathology* 49: 175-195.
- Tedeschi, R., Bosco, D., Alma, A. 2002. Population dynamics of *Cacopsylla melanoneura* (Homoptera: Psyllidae), a vector of apple proliferation phytoplasma in northwestern Italy. *Journal of Economic Entomology* 95: 544-551.
- Tedeschi, R., Alma, A. 2004. Transmission of Apple Proliferation phytoplasma by *C. melanoneura* (Homoptera: psyllidae). *Journal of Economic Entomology* 97: 8-13.
- Tedeschi, R., Baldesari, M., Mazzoni, V., Trona, F., Angeli, G. 2012. Population dynamics of *Cacopsylla melanoneura* (Hemiptera: Psyllidae) in northeast Italy and its role on Apple proliferation epidemiology in apple orchards. *Journal of Economic Entomology* 105(2): 322-8.
- Thebaud, G., Sauvion, N., Chadoeuf, J., Dufils, A., Labonne, G. 2006. Identifying risk factors for European stone fruit yellows from a survey. *Phytopathology* 96: 890-899.
- Thebaud, G., Yvon, M., Alari, R., Sauvion, N., Labonne, G. 2009. Efficient transmission of ‘*Candidatus Phytoplasma prunorum*’ is delayed by eight months due to a long latency in its host-alternating vector. *Phytopathology* 99: 265-273.

- Togores, P. 2002. Tratado de viticultura general. Ed. Mundiprensa. 1235pp.
- Torres, E., Botti, S., Paltrinieri, S., Martín, M.P., Bertaccini, A. 2002. First report of *Spartium* witches' broom disease in Spain. *Plant Pathology* 51: 807.
- Torres, E., Martín, M.P., Paltrinieri, S., Vila, A., Masalles, R., Bertaccini, A. 2004. Spreading of ESFY phytoplasmas in Stone fruit in Catalonia. *Journal of Phytopathology* 152(7): 432-437.
- Torres, E, Bertolini, E., Cambra, M., Montón, C., Martín, M.P. 2005. Real-time PCR for simultaneous and quantitative detection of quarantine phytoplasmas from apple proliferation (16 SrX) group. *Molecular and Cellular Probes* 19(5): 334-40.
- Torres, E., Bech, J., Laviña, A. , Sabaté, J., Calvo, M., Batlle, A. 2011. Evaluation of susceptibility of plum-trees to 'Candidatus *Phytoplasma prunorum*' using real-time PCR. *Bulletin of Insectology* 64: 189-190.
- Tran-Nguyen, L., Kube, M., Schneider, B., Reinhard, R., Gibb, K. 2007. An overview of the genome sequence of "Candidatus *Phytoplasma australiense*" – Australian strain. *Bulletin of Insectology* 60 (2): 111-112.
- Trivellone, V., Pinzauti, F., Bagnoli, B. 2005. *Reptalus quinquecostatus* (Dufour) (*Auchenorrhyncha: Cixiidae*) as a possible vector of Stolbur-phytoplasma in a vineyard in Tuscany. *Redia* 88: 103–108.
- Wayadande, A.C. 1995. Transmission of *Spiroplasma citri* Lines and their ability to cross gut and salivary gland barriers within the leafhopper vector *Circulifer tenellus*. *Phytopathology* 85: 1256-1259.
- Wei, W., Davis, R.E., Lee, I.M., Zhao, Y. 2007. Computer-simulated RFLP analysis of 16S rRNA genes: identification of ten new phytoplasma groups. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology* 57: 1855–1867.

- Weintraub, P.G., Beanland, L. 2006. Insect vectors of phytoplasmas. *Annual Review of Entomology* 51: 91-111.
- Weintraub, P.G., Jones, P. 2010. *Phytoplasmas: genomes, plant hosts and vectors*. Ed. CABI. 331 pp.
- Wilson, M.R., Weintraub, P.G. 2007. An introduction to Auchenorrhyncha phytoplasma vectors. *Bulletin of Insectology* 60 (2): 177-178.
- Yvon, M., Labonne, G., Thebaud, G. 2004. Survival of european stone fruit yellows phytoplasma outside fruit crop production areas: a case study in southeastern France. *Acta Horticulturae* 657: 477-481

ANNEX I ÍNDEX DE FIGURES

Figura 1. Parcel·la de presseguers afectada i arrencada	Pag.16
Figura 2. <i>P. halepensis</i> amb proliferació causada per ‘Ca. P. pini’	Pag.19
Figura 3. <i>Euscelidius variegatus</i>	Pag.22
Figura 4. <i>Cacopsylla pulchella</i>	Pag.22
Figura 5. <i>Philaenus spumarius</i>	Pag.22
Figura 6. Rebrot del patró <i>P. marianna</i> amb proliferacions i filimorfismes.	Pag.25
Figura 7. Apoplexia en <i>P. persica</i> .	Pag.26
Figura 8. Brotació anticipada en <i>P. salicina</i> .	Pag.26
Figura 9. Desfasament fenològic en <i>P. salicina</i>	Pag.27
Figura 10. Genitàlia masculina de <i>C. pruni</i> .	Pag.29
Figura 11. Proliferacions en pomera.	Pag.31
Figura 12. <i>C. picta</i> : femella i mascle hivernals.	Pag.32
Figura 13. Genitàlia masculina de <i>C. picta</i> .	Pag.32
Figura 14. Mascle estival <i>C. picta</i> .	Pag.32
Figura 15. Perers afectats de “Pear decline”	Pag.35
Figura 16. Presseguer amb símptomes de “Peach yellow leaf roll”	Pag.36
Figura 17. Vinya afectada de Flavescència daurada.	Pag.39
Figura 18. <i>Scaphoideus titanus</i> .	Pag.40
Figura 19. Síntomes de fusta negra en la varietat chardonnay	Pag.43
Figura 20. Síntomes de fusta negra en la varietat garnatxa	Pag.43
Figura 21. Síntomes de fusta negra en la varietat chardonnay	Pag.43
Figura 22. <i>Hyalesthes obsoletus</i>	Pag.45

ANNEX II ÍNDEX D'ABREVIATURES

ADN: Àcid desoxiribonucleic

AP: “Apple proliferation”

ARN: Àcid ribonucleic

ATP: Adenosina trifosfat

AY: “Aster yellows”

BN: “Bois Noir”

BP: Parells de bases

ELISA: “Enzyme linked immunosorbent assay”

ESFY “European stone fruit yellows”

EY: “Elm yellows”

FD: Flavescència daurada

LAMP: “Loop mediated isothermal amplification”

MLO: “Mycoplasma like organism”

PCR: “Polymerase chain reaction”

PD: “Pear decline”

PYLR: “Peach yellow leaf roll”

RFLP: “Restriction fragment length polymorfism”

STOL: “Stolbur”

ANNEX III CLASSIFICACIÓ DELS FITOPLASMES

16Sr: Grup /Subgrup (' <i>Candidatus Phytoplasma</i> spp.')	GeneBank nºAccés	Referència
16Srl: Aster yellows		
I-A Aster yellows witches'-broom phytoplasma (AYWB) rrnA	NC-007716	Bai et al. (2006)
I-B Onion yellows phytoplasma mild strain (OY-M) rrnA	NC-005303	Oshima et al.(2004)
I-B ' <i>Ca. P. asteris</i> '	M30790	Lee et al. (2004a)
I-C Clover phyllody phytoplasma strain CPh	AF222065	IRPCM (2004)
I-D Aster yellows phytoplasma strain PaWB	AY265206	IRPCM (2004)
I-E Blueberry stunt phytoplasma strain BBS3	AY265213	IRPCM (2004)
I-F Aster yellows phytoplasma strain ACLR-AY	AY265211	IRPCM (2004)
16SrlI: Peanut WB		
II-A Peanut witches'-broom phytoplasma	L33765	Gundersen et al. (1994)
II-B ' <i>Ca. P. aurantifolia</i> '	U15442	Zreik et al. (1995)
II-C Cactus witches'-broom phytoplasma	AJ293216	Cai et al. (2002)
II-D ' <i>Ca. Phytoplasma australasiae</i> '	Y10097	White et al. (1998)
16SrlII: X-disease		
III-A <i>Ca. P. pruni</i> (Western X-disease phytoplasma)	L04682	IRPCM (2004)
III-B Clover yellow edge phytoplasma	AF189288	IRPCM (2004)
16SrlIV: Coconut lethal yellows		
IV-A Coconut lethal yellowing phytoplasma (LYJ-C8)	AF498307	Harrison et al. (2002a)
IV-B Phytoplasma sp. LfY5(PE65)-Oaxaca	AF500334	Harrison et al. (2002b)
IV-D Carludovica palmata leaf yellowing phytoplasma	AF237615	Cordova et al. (2000)
16SrlV: Elm yellows		
V-A ' <i>Ca. Phytoplasma ulmi</i> '	AY197655	Lee et al. (2004b)
V-B ' <i>Ca. Phytoplasma ziziphi</i> ' strain JWB-G1	AB052876	Jung et al. (2003a)
V-C ' <i>Ca. Phytoplasma vitis</i> Alder yellows phytoplasma strain	AY197642	Lee et al. (2004b)
V-D Grapevine Flavescence doree oriental	AF176319	IRPCM (2004)
V-G ' <i>Ca. Phytoplasma ziziphi</i> '-related strain JWB-Kor1	AB052879	Jung et al. (2003a)
16SrlVI: Clover proliferation		
VI-A ' <i>Ca. Phytoplasma trifolii</i> '	AY390261	Hiruki & Wang (2004)
16SrlVII: Ash yellows grupo		
VII-A ' <i>Ca. Phytoplasma fraxini</i> '	AF092209	Griffiths et al. (1999)
16SrlVIII: Loofah witches'-broom		
VIII-A ' <i>Ca. Phytoplasma luffae</i> '	AF353090	IRPCM (2004)
16SrlIX: Pigeon pea witches'-broom		
IX-A Pigeon pea witches'-broom phytoplasma	AF248957	IRPCM (2004)
IX-D ' <i>Ca. Phytoplasma phoenicium</i> '	AF515636	Verdin et al. (2003)
16SrlX: Apple proliferation		
X-A ' <i>Ca. Phytoplasma mali</i> '	AJ542541	Seemüller (2004)
X-B ' <i>Ca. Phytoplasma prunorum</i> '	AJ542544	Seemüller (2004)
X-C ' <i>Ca. Phytoplasma pyri</i> '	AJ542543	Seemüller (2004)
X-D ' <i>Ca. Phytoplasma spartii</i> '	X92869	Marcone et al. (2004a)
16SrlXI: Rice yellow dwarf		
XI-A ' <i>Ca. Phytoplasma oryzae</i> '	AB052873	Jung et al. (2003b)
16SrlXII: Stolbur		
XII-A ' <i>Ca. Phytoplasma solani</i> '*	AJ964960	Firrao et al. (2005)
XII-B ' <i>Ca. Phytoplasma australiense</i> '	L76865	Davis et al. (1997)
XII-C Strawberry lethal yellows phytoplasma	AJ243045	Padovan et al. (2000b)
XII-D ' <i>Ca. Phytoplasma japonicum</i> '	AB010425	Sawayanagi et al. (1999)
XII-E ' <i>Ca. Phytoplasma fragariae</i> '	DQ086423	Valiunas et al. (2006)
16SrlXIII: Mexican periwinkle virescence		
XIII-A Mexican periwinkle virescence phytoplasma	AF248960	IRPCM (2004)
16SrlXIV: Bermudagrass white leaf		
XIV-A ' <i>Ca. Phytoplasma cynodontis</i> '	AJ550984	Marcone et al. (2004b)

16SrXV: Hibiscus witches'-broom XV-A 'Ca. Phytoplasma brasiliense'	AF147708	Montano et al. (2001)
16SrXVI: Sugar cane yellow leaf syndrome XVI-A 'Ca. Phytoplasma graminis'	AY725228	Arocha et al. (2005)
16SrXVII: Papaya bunchy top group XVII-A 'Ca. Phytoplasma caricae'	AY725234	Arocha et al. (2005)
16SrXVIII: American (TX+NE) potato purple top wilt XVIII-A 'Ca. Phytoplasma americanum'	DQ174122	Lee et al. (2006)
16SrXIX: Japanese chestnut witches'-broom XIX-A 'Ca. Phytoplasma castaneae'	AB054986	Jung et al. (2002)
16SrXX: Buckthorn witches' broom XX-A 'Ca. Phytoplasma rhamni'	X76431	Marcone et al. (2004a)
16SrXXI: Pine shoot proliferation XXI-A 'Ca. Phytoplasma pini'	AJ632155	Schneider et al. (2005)
16SrXXII: Nigerian coconut lethal decline (LDN) XXII- A Phytoplasma sp. strain LDN	Y14175	Tymon et al. (1998)
16SrXXIV: Sorghum bunchy shoot XXIV-A Sorghum bunchy shoot phytoplasma	AF509322	Blanche et al. (2003)
16SrXXV: Weeping tea tree witches'-broom XXV-A Weeping tea witches'-broom phytoplasma	AF521672	IRPCM (2004)
16SrXXVI: Mauritius sugar cane yellows D3T1 XXVI-A Sugar cane phytoplasma D3T1	AJ539179	IRPCM (2004)
16SrXXVII: Mauritius sugar cane yellows D3T2 XXVII-A Sugar cane phytoplasma D3T2	AJ539180	IRPCM (2004)
16SrXXVIII: Havana derbid phytoplasma XXVIII-A Derbid phytoplasma	AY744945	IRPCM (2004)
16SrXXIX: Cassia witches'-broom group XXIX-A 'Ca. P. omanense'	EF666051	Al-Saady (2008)
16SrXXX: Salt cedar witches'-broom XXX-A 'Ca. P. tamaricis'	FJ432664	Zhao et al. (2009b)