

Phytoplasmes et phytoplasmoses : caractéristiques, symptômes et diagnostic

Marie-Thérèse Cousin, Élisabeth Boudon-Padieu

Caractéristiques des phytoplasmes

Jusqu'en 1967, les maladies de végétaux de type « jaunisse » étaient reliées aux maladies virales. Les agents pathogènes responsables de ces maladies partagent en effet certaines de leurs propriétés avec les virus du phloème : transmissibilité par greffage et par insecte-vecteur, multiplication à la fois chez la plante et l'insecte-vecteur, absence de transmission mécanique. Cependant, les méthodes utilisées jusqu'alors pour la purification des virus avaient échoué, tandis que la présence d'ADN anormal dans les tubes criblés suggérait une localisation phloémique des agents en cause. Les progrès de la microscopie électronique sur coupes devaient permettre de préciser leur nature exacte [1]. L'observation de coupes ultrafines de plantes infectées révèle la présence, dans le phloème, de

micro-organismes dépourvus de paroi, contrairement aux bactéries classiques. Ils sont limités par une membrane à trois feuillettes (deux feuillettes denses aux électrons entourant un feuillet clair), à l'intérieur de laquelle on distingue des filaments d'ADN ainsi que des ribosomes de taille différente de ceux de la plante-hôte. Ces phytoplasmes sont polymorphes et capables de franchir les cribles des tubes criblés. Leur taille varie de 100 nm à plus d'un micron ; leur forme est ovoïde, filamenteuse, en Y, en haltères, mais jamais spiralée (figure 1). Ce polymorphisme est particulièrement visible sur coupes épaisses, atteignant un micron d'épaisseur, observées en microscopie électronique par transmission ou en balayage. La plupart des phytoplasmes sont localisés dans les tubes criblés, parfois dans le parenchyme libérien, exceptionnellement dans le parenchyme cortical chez la féverole et la cuscute.

L'absence de paroi explique que ces micro-organismes soient sensibles aux antibiotiques du groupe des tétracyclines qui agissent sur la synthèse protéique, mais résistants aux pénicillines qui agissent sur la paroi bactérienne. Elle leur confère aussi une forte sensibilité aux variations de pression osmotique, d'où leur localisation presque exclusive dans la sève des tubes criblés, dont la pression osmotique atteint 10 à 12 atmosphères.

Les phytoplasmes furent désignés tout d'abord sous l'appellation *Mycoplasma-like organisms* (MLO) en raison de leur similitude d'aspect en microscopie électronique avec les mycoplasmes animaux appartenant à la famille des mollicutes

(étymologiquement micro-organismes à peau molle, donc dépourvus de paroi cellulaire). Cependant, contrairement aux mycoplasmes *stricto sensu*, la culture des MLO en milieu acellulaire n'a pu être réalisée. Les principaux caractères des phytoplasmes figurent au tableau 1 ; certains sont communs à l'ensemble des mollicutes, d'autres leur sont spécifiques. Le phloème des plantes peut aussi contenir des bactéries avec paroi dont la culture *in vitro* n'a pas été réalisée. Ces bactéries sont nommées *fastidieuses* (littéralement « exigeantes ») par les auteurs anglophones, et *dysphagobactéries* (difficiles à nourrir) par les francophones. Parfois confondues avec les phytoplasmes, elles s'en distinguent par la présence d'une paroi visible aux forts grossissements du microscope électronique.

Les tubes criblés peuvent aussi contenir un autre groupe de mollicutes, à morphologie spiralée, les « spiroplasmés », cultivables en milieu acellulaire. Des spiroplasmés saprophytes ont été aussi décrits à la surface des fleurs. Contrairement aux spiroplasmés, tous les phytoplasmes actuellement connus sont phytopathogènes et intracellulaires.

Les progrès de la biologie moléculaire ont apporté des avancées considérables dans la connaissance des mollicutes. La purification de l'ADN des phytoplasmes a permis de le comparer à l'ADN de mollicutes cultivables et de bactéries à paroi. Cela fut obtenu par centrifugation en gradient de densité, l'ADN des mollicutes étant particulièrement riche en nucléotides A et T, contrairement à celui des bactéries à paroi.

M.-T. Cousin : Institut national de la recherche agronomique, Station de pathologie végétale, route de Saint-Cyr, 78026 Versailles, France.

É. Boudon-Padieu : Inra, Laboratoire de phytoparasitologie, Équipe phytoplasmes, BP 86510, 21065 Dijon Cedex, France.

Tirés à part : É. Boudon-Padieu

Thèmes : Protection phytosanitaire.



Figure 1. Ultrastructure des phytoplasmes. *Phytoplasma* polymorphes. Déformation de certains d'entre eux qui franchissent les cribles de la paroi du tube criblé. À gauche, fibres de protéine P (protéine caractéristique du phloème) (documents M.-T. Cousin).

Figure 1. Phytoplasma ultrastructure. Polymorphous phytoplasmas. Change of the shape of some of them which move through the sieve tube pores. Left, P protein filaments (protein characteristic of the phloem tissue) (documents M.-T. Cousin).

L'étude de l'ADN ribosomique (gène de l'ARNr) (fraction 16S et espaceur situé entre les fractions 16S et 23S), montre son caractère unique, l'espaceur contenant un seul ARNt isoleucine contrairement aux mycoplasmes *stricto sensu* qui en sont dépourvus ou aux spiroplasmes et aux bactéries à paroi où l'on observe une diversité de l'ARNt dans deux ou trois espaceurs différents. En raison de ces particularités, le Comité international de taxonomie des mollicutes décida, en juillet 1994, de remplacer l'appellation « MLO » par « phytoplasmes » car, bien qu'ils se multiplient à la fois chez la plante et chez l'insecte-vecteur, ils sont essentiellement phytopathogènes. Chez les phytoplasmes, le codon UGA fonctionne comme codon d'arrêt, comme chez les bactéries à paroi et les acholéplasmes, contrairement aux spiroplasmes qui ont un codon UGA correspondant au tryptophane [2].

Récemment, les techniques d'électrophorèse en champ pulsé ont permis de séparer le chromosome entier de certains phytoplasmes [3, 4] dont la taille, qui ne

dépasse pas 600 kpb dans le cas des dépérissements d'espèces ligneuses, est la plus petite actuellement connue parmi les organismes pouvant se répliquer de façon autonome. Cette petite taille correspond à une évolution régressive avec élimination progressive des séquences non codantes et perte de gènes. On admet que le génome des phytoplasmes de la jaunisse de la reine-marguerite (*aster yellows*, AY), qui mesure 1 200 kpb, est constitué de deux chromosomes ayant un grand nombre de séquences en commun. Au cours de l'évolution, seul un chromosome aurait subsisté chez les agents du dépérissement des ligneux.

La position phylogénétique des phytoplasmes au sein des bactéries est essentiellement basée sur l'étude de l'ADN ribosomique (fraction 16S et espaceur 16S/23S). En clonant et en séquençant l'ADN r16S de phytoplasmes et de bactéries classiques on a montré, en utilisant la méthode cladistique ou de parcimonie, que les phytoplasmes dérivent de *Bacillus subtilis* (bactérie gram⁺) [5]. La méthode de parcimonie consiste à comparer des séquences entières, base à base. Le logiciel PAUP (*Phylogenetic Analysis Using Parsimony*) est utilisé pour l'établissement d'arbres phylogénétiques. Les résultats obtenus montrent que les phytoplasmes sont plus proches, phylogénétiquement, des *Acholeplasma* (mollicutes saprophytes) et des *Anaeroplasmata* (mollicutes anaérobies), que des mycoplasmes animaux et des spiroplasmes. Tous possèdent *Bacillus subtilis* comme ancêtre commun (figure 2). Les résultats obtenus à partir de l'espaceur 16S/23S ont confirmé et précisé la position phylogénétique établie à partir de la fraction 16S.

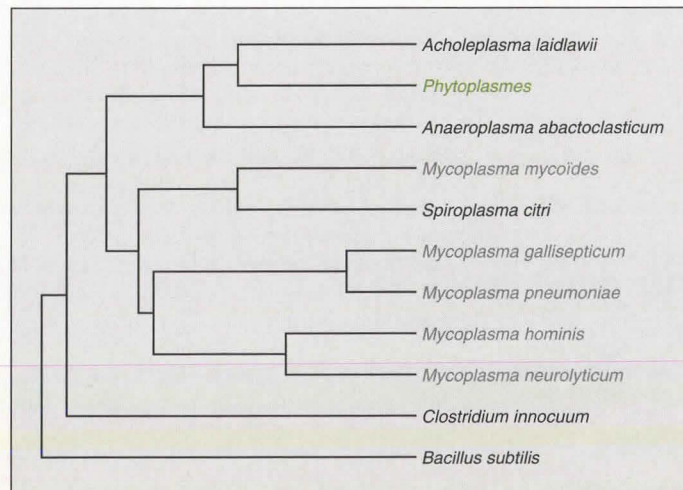


Figure 2. Situation des phytoplasmes parmi les mollicutes et deux bactéries classiques (arbre phylogénétique établi à partir de la fraction 16S de l'ADN ribosomique) (documents B.B. Sears et B.C. Kirkpatrick).

Figure 2. Position of phytoplasmas among mollicutes and two typical bacteria (phylogenetic tree constructed by using the 16S DNA ribosomal fragment) (documents B.B. Sears and B.C. Kirkpatrick).

Tableau 1

Caractères comparés des bactéries classiques, des mollicutes et des virus des plantes

	Bactéries à l'exception des mollicutes		Mollicutes		Virus
Paroi	oui (à l'exception des formes L)		non		
Sensibilité aux antibiotiques	Antibiotiques actifs sur les synthèses pariétale et protéique		Antibiotiques actifs sur la synthèse protéique (tétracycline)		non
Visibilité au microscope photonique	oui		oui (limite)		non
Acides nucléiques	ADN + ARN		ADN + ARN		ADN ou ARN
	Bactéries classiques	Bactéries du phloème	Spiroplasma	Phytoplasmes	Virus
Croissance sur milieu acellulaire	oui	non	oui	non	non
Localisation	extracellulaire (parenchyme et xylème)	intracellulaire (phloème)	intra- et extracellulaire (phloème et surface des fleurs)	intracellulaires (phloème)	intracellulaire (parenchyme et phloème)
Taille du génome	3 000 à 5 000 kpb		1 500 kpb	1 200 kpb (aster yellows) 600 kpb (déperissement des ligneux)	4 à 50 kpb
Teneur en G + C	50 à 78 %		25 à 31 %	23 à 26 %	
tRNA situé dans l'espaceur 16S/23S	Diversité des ARNt		Diversité des ARNt	un seul ARNt isoleucine	
Fonctionnement du codon UGA	codon d'arrêt		codon tryptophane	codon d'arrêt	

Compared characters of typical bacteria, mollicutes and viruses of plants

Caractéristiques des phytoplasmoses

On a répertorié [6] plus de 100 maladies à phytoplasmes entraînant une dégradation de la qualité des produits et parfois une destruction des récoltes, plus fréquemment en régions tropicales en raison de la présence ininterrompue des plantes-hôtes et des insectes-vecteurs. Les spiroplasma contiennent trois espèces phytopathogènes : *Spiroplasma citri*, *Spiroplasma kunkelii* et *Spiroplasma phoeniceum*.

Symptômes

Les symptômes de phytoplasmoses présentent des risques de confusion avec les effets de traitements herbicides ou de carences minérales.

Les phytoplasmes affectent l'appareil floral et végétatif avec des anomalies tératologiques (virescence, phylodie, prolifération) souvent caractéristiques. La virescence (figure 3a) consiste en un verdissement des pièces florales sans altération morphologique. À ce verdissement s'ajoute parfois une déformation des organes floraux, étamines et pistils, qui



Figure 3. Symptômes de phytoplasmoses. a. (à gauche) Virescence du cotonnier. b. (à droite) Flèche morte et jaunissement sectoriel de *Populus nigra* cv Italica atteint de la maladie du balai de sorcière. (documents M.-T. Cousin).

Figure 3. Symptoms of phytoplasma diseases. a. (left) Cotton virescence. b. (right) Dieback and sectorial yellowing of *Populus nigra* cv Italica infected with the witches' broom disease (documents M.-T. Cousin).

évoluent en lames foliacées dans le cas de la phyllodie. Enfin, dans certains cas, on observe une prolifération importante du pistil et du réceptacle ou des altérations discrètes résultant de l'avortement des pièces florales.

Diverses anomalies du système végétatif sont aussi observées. Le jaunissement ou « flavescence » du feuillage fut à l'origine de l'appellation « maladies de type jaunisse » ou *yellow*s. Sa localisation à un secteur du végétal, chez les plantes ligneuses en particulier, constitue un indice de phytoplasme (figure 3b). Le jaunissement n'est pas la seule altération de coloration décelée, une teinte violacée étant aussi fréquemment observée. La consistance des feuilles des plantes infectées est modifiée : elles s'épaississent, deviennent raides et cassantes et s'incurvent fréquemment vers la base de la plante (symptôme d'épinastie). Sur les ormes américains on observe aussi une grave nécrose du phloème suivie de la mort des arbres. Enfin, dans le cas des essences ligneuses, avant la mort de l'arbre, on assiste souvent à un dépérissement caractéristique, *lethal decline* ou *dieback* (figure 3b). La flèche terminale ou parfois plusieurs pousses dépérissent alors qu'une prolifération est observée à la base de l'arbre. Ce dépérissement est extrêmement rapide, en particulier dans le cas du *dieback* du papayer. L'inhibition des bourgeons terminaux s'accompagne souvent de la prolifération des bourgeons axillaires, contribuant à la formation de balais de sorcière ou *witches' broom*. Ce phénomène traduit un déséquilibre hormonal qui peut être confondu avec des traitements herbicides. Les phytoplasmes hivernent dans les racines et sont inégalement répartis dans les parties aériennes de la plante. Cette distribution sectorielle a été observée dans de nombreux cas (balai de sorcière du peuplier, dépérissement jaune du lavandin et maladies à phytoplasmes de la vigne). Plusieurs hypothèses (absence de phytoplasmes dans les parties dépourvues de symptômes, taux trop faible pour l'induction des symptômes, phénomènes de rétablissement liés à des formes dégénérées de phytoplasmes) peuvent expliquer ce phénomène. Le chevelu racinaire est réduit ; chez *Catharanthus roseus* atteint de « stolbur », les racines deviennent raides et l'angle d'insertion sur les racines d'ordre supérieur est considérablement augmenté. L'importance de la colonisation des racines a été mise en évidence dans le cas de nom-

breuses essences ligneuses, arbres fruitiers en particulier. Les légumineuses infectées perdent le pouvoir de fixer l'azote atmosphérique.

Rétablissement avec disparition de la maladie ou mortalité

Le phénomène de « rétablissement » a été signalé dès 1961 pour la « flavescence dorée de la vigne » sur des vignes malades protégées contre les réinoculations au vignoble [7]. Il a été étudié au laboratoire sur des boutures prélevées sur *Populus nigra* cv *Italica* atteint de dépérissement, et conservées en serre à l'abri d'insectes-vecteurs (figure 4) [8]. Trois lots de boutures furent choisis en fonction de l'intensité des symptômes lors de leur prélèvement au cours de l'été (date 0) : symptômes légers (lot A), intermédiaires (lot B) et graves (lot C). L'évolution des symptômes fut notée l'année suivante (dates 1, 2, 3, 4). Dans tous les cas, on observa une évolution, soit vers la disparition des symptômes, soit vers la mort des boutures, le pourcentage de boutures rétablies ou mortes dépendant de leur état initial lors du prélèvement. Le taux de mortalité,

inférieur à 10 % dans le lot A, atteignait 30 % dans le lot B et 70 % dans le lot C. Lors de la dernière notation (4), tous les symptômes de la maladie avaient disparu sur les boutures ayant survécu (figure 4). La disparition des symptômes se manifeste dès la seconde notation pour les lots A et C et lors de la dernière notation (4) en ce qui concerne le lot B.

Des phénomènes comparables furent observés chez les lavandins atteints de dépérissement jaune, le taux de boutures rétablies ou mortes dépendant de l'intensité des symptômes lors de la récolte des boutures. Dans le cas du dépérissement de la lavande fine, les boutures de plantes infectées maintenues en serre ne présentaient pas de symptômes pendant une certaine période, puis ces boutures mouraient soudainement. La conservation de la maladie en serre sur certaines espèces se révèle donc difficile en l'absence du vecteur.

Modes de conservation des phytoplasmoses

Afin de conserver les agents des phytoplasmoses en l'absence du vecteur, il convient de disposer d'une espèce végé-

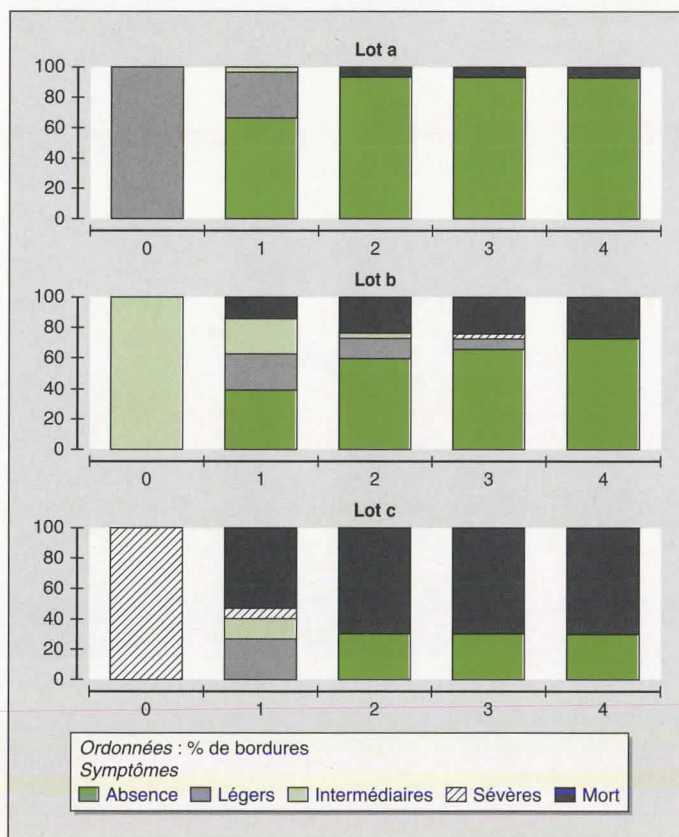


Figure 4. Phénomènes de rétablissement et mortalité, observés sur des boutures de *Populus nigra* cv *Italica*, atteintes de la maladie du balai de sorcière (WB) et cultivées en l'absence d'insectes-vecteurs (documents M.-T. Cousin). Intensité des symptômes lors du prélèvement (date 0) : (lot a) symptômes légers ; (lot b) intermédiaires ; (lot c) sévères. Dates de notation des symptômes, l'année suivant le prélèvement (date 0) : (1) juin ; (2) début juillet ; (3) fin juillet ; (4) août.

Figure 4. Natural recovery or death, observed on *Populus nigra* cv *Italica* cuttings, infected with the witches' broom disease (WB) and grown without vectors (documents M.-T. Cousin).

tales où la maladie n'évolue ni vers la guérison ni vers la mort de la plante. La plupart des phytoplasmes qu'il est difficile, voire impossible, de conserver durablement en serre sur leur plante-hôte d'origine peuvent être maintenus indéfiniment sur *Catharanthus roseus*. De nombreux isolats, parmi lesquels la phylodie du trèfle, le dépérissement jaune du lavandin, ont été transmis par cuscute à *C. roseus* où ils sont maintenus par greffe de greffons malades sur des plants sains. Dans d'autres cas (flavescence dorée), les phytoplasmes ont été transmis à *C. roseus* par un insecte-vecteur. Cependant, il existe des cas où la transmission à *C. roseus* par cuscute ou par insecte n'a pas été obtenue. Une alternative pour le maintien des phytoplasmes consiste alors à effectuer la culture *in vitro* de la plante-hôte infectée. Ainsi, le balai de sorcière du peuplier blanc a été conservé *in vitro* sur des explants de ce peuplier pendant plusieurs années successives [9].

Modes de propagation des phytoplasmoses

La transmission des phytoplasmoses s'effectue principalement par des insectes piqueurs-suceurs qui pompent la sève dans les tubes criblés de la plante. Ils appartiennent à l'ordre des hémiptères cicadomorphes, en particulier *Jassidae*, fulgoromorphes *Cixiidae* et sternorhynques *Psyllidae*.

Les phytoplasmoses ne sont pas transmissibles par les semences, mais les parties végétatives contaminées peuvent les propager au cours des pratiques culturales (bouturages et greffages), particulièrement dans le cas de la production des plantes ligneuses. Le bouturage de scions à partir de pieds-mères infectés est responsable de la propagation de la flavescence dorée de la vigne à une fréquence élevée. Cette propagation est insidieuse lorsque la prise de bouture est faite sur des pieds-mères contaminés l'année précédente et qui ne montrent pas encore de symptômes ou des pieds-mères de porte-greffes tolérants infectés [10]. Lorsque les greffes sont effectuées à partir de matériel (porte-greffe ou greffon) contaminé par la flavescence dorée de la vigne, le matériel greffé peut dépérir rapidement, ou apparaître sain pendant plusieurs saisons avant de présenter des symptômes de la maladie. Ce dernier cas s'avère particulièrement dangereux si le matériel a été expédié dans des zones

où la maladie n'existe pas, mais où le vecteur potentiel est présent [11]. La propagation par la greffe a aussi été signalée, à faible fréquence, dans le cas du « bois noir » de la vigne.

Méthodologie du diagnostic

Méthodes biologiques (greffage, cuscute)

L'indexage par greffage sur une variété particulièrement sensible a été utilisé et l'est encore lorsque la détection directe du phytoplasme est insuffisamment sensible et fiable. Il est particulièrement utile pour l'indexage de porte-greffes de vigne tolérants à la flavescence dorée avec des scions appartenant à une variété sensible. Les plantes à l'étude doivent être soigneusement observées et il faut parfois attendre une seconde année après le greffage pour que les symptômes s'extériorisent [11]. Dans le cas des plantes ligneuses, l'indexage peut être utilisé comme une amplification biologique de l'agent pathogène, préalable à sa détection et à sa caractérisation qui sont souvent plus aisées dans le greffon de la variété indicatrice que dans la bouture prélevée sur les pieds-mères, en raison du titre plus élevé en phytoplasmes dans les jeunes feuilles de la variété indicatrice.

La cuscute permet la transmission de phytoplasmes de la plante étudiée à une plante-hôte d'une autre famille, en établissant un pont vivant. Elle est particulièrement utile lorsque la conservation de la maladie sur la plante cultivée s'avère difficile. Parmi les hôtes différentiels fréquemment utilisés, *Catharanthus roseus* occupe une place prépondérante car les phytoplasmes s'y multiplient souvent plus abondamment que chez la plante-hôte d'origine. Ces méthodes biologiques ne sont pas spécifiques, eu égard à la similitude de symptômes causés par des phytoplasmes différents dans une même espèce végétale. Toutefois, *C. roseus* exprime souvent mieux l'ensemble des symptômes que la plante d'origine.

Méthodes histologiques

Ces méthodes sont utilisables lorsque les phytoplasmes sont présents en concentration suffisante.

Méthodes histologiques aspécifiques

L'autofluorescence, ou fluorescence primaire, correspond à la fluorescence naturelle de la plante. Avant même l'observation des phytoplasmes en microscopie électronique, la comparaison de coupes de plantes saines ou infectées en lumière fluorescente bleue (450 nm), permet de différencier les tissus libériens de plantes saines (tubes criblés non fluorescents) de ceux de plantes malades (autofluorescence de ces tubes) [12].

Dans le cas du papayer atteint de dépérissement (*dieback*), l'autofluorescence des laticifères a été suivie conjointement à la colonisation de la plante par les phytoplasmes [13]. L'autofluorescence est un signal précoce de maladie correspondant à une réaction de défense de la plante, sans corrélation avec la présence des phytoplasmes, ce qui suggère la présence de toxines induites par les phytoplasmes.

La détection de la callose par le bleu d'aniline en lumière fluorescente bleue permet le diagnostic de certaines phytoplasmoses. Les tubes criblés adultes sains sont en effet dépourvus de callose, qui se limite aux jeunes tubes au cours de leur maturation. Chez les plantes atteintes de phytoplasmes, la callose persiste après la maturation des tubes criblés ; il en est de même pour les grains de pollen adultes des plantes saines qui sont dépourvus de callose alors que cette substance est décelée dans le pollen des plantes infectées par des phytoplasmes.

L'observation topographique de colorations sur coupes semi-fines est recommandée avant toute observation en microscopie électronique. Une corrélation entre microscopie photonique et électronique peut être établie en disposant de coupes sériées de 350 nm environ, récoltées alternativement sur lames pour l'observation en microscopie photonique et sur grilles pour la microscopie électronique.

Méthodes histologiques spécifiques de l'ADN

Les phytoplasmes contenant des acides nucléiques, dont la lumière des tubes criblés sains est dépourvue, les méthodes histologiques de diagnostic utilisent des colorants spécifiques de l'ADN : réactif de Feulgen en lumière normale ou fluorochromes en lumière fluorescente qui augmentent la sensibilité du diagnostic. La fluorescence du DAPI (4'-6 diamidino-2 phénylindole-2 HCl) observée en lumière ultra-violet (380 nm) détecte des molécules d'ADN préférentiellement

riches en nucléotides A et T [14] et fut utilisée pour le diagnostic et la localisation des phytoplasmes. Les phytoplasmes peuvent être présents non seulement dans les tubes criblés adultes (dont le cytoplasme a disparu), mais aussi à l'intérieur des jeunes tubes criblés en cours de maturation, contenant plastides et mitochondries. Cette méthode est trop peu sensible pour déceler les phytoplasmes d'arbres et arbustes où ils sont en nombre réduit, en particulier dans le cas du peuplier d'Italie (atteint de la maladie des balais de sorcière) ou dans la vigne.

Méthodes histologiques spécifiques par immunomarquage

Des anticorps polyclonaux [15-18] et monoclonaux [17, 19, 20] ont été obtenus pour certains phytoplasmes. Ces anticorps sont spécifiques et il n'existe pas d'antisérum universel contre l'ensemble des maladies à phytoplasmes (contrairement aux amorces universelles pour les phytoplasmes utilisables en PCR). Ils sont particulièrement adaptés à la détection des phytoplasmes *in situ* par immunofluorescence ou par immunomarquage [21, 22]. L'immunofluorescence utilise la fluorescence en lumière bleue (450 nm) de l'isothiocyanate de fluorescéine fixé sur un anticorps, pour révéler la présence d'antigènes homologues présents dans les tissus infectés. Dans le cas de l'immunomarquage, l'antisérum est couplé à l'or colloïdal qui permet le repérage en microscopie électronique ou est amplifié à l'argent pour le repérage en microscopie photonique. L'immunomarquage par des anticorps spécifiques de la flavescence dorée de la vigne, a permis l'étude du cheminement des phytoplasmes aussi bien dans la plante que dans le vecteur [21, 22], ainsi que la détection simultanée de plusieurs phytoplasmes dans leurs hôtes en utilisant des particules d'or colloïdal de différentes dimensions.

Les anticorps permettent l'identification et l'étude des protéines membranaires majeures des phytoplasmes, piste pour les recherches sur les interactions hôte-phytoplasme. Dans ce domaine, les anticorps polyclonaux ont été utilisés pour montrer l'existence de sites récepteurs des phytoplasmes de la flavescence dorée de la vigne sur les cellules de l'hôte, en pratiquant, sur une coupe d'organe sain, une absorption de phytoplasmes contenus dans un extrait

et en révélant ensuite les phytoplasmes absorbés à l'aide des anticorps couplés à l'or colloïdal [23]. Des anticorps monoclonaux ont permis la purification par immunoaffinité de phytoplasmes intègres et infectieux de la flavescence dorée [24] ainsi que l'identification de la protéine majeure de la prolifération du pommier [25].

Utilisation des différentes méthodes histologiques

L'autofluorescence des tissus libériens constitue un premier indice dans le diagnostic des phytoplasmes. Les fluorochromes de l'ADN et surtout l'immunofluorescence sont plus spécifiques (figure 5). La fluorescence secondaire en DAPI, observée en lumière UV (380 nm), révèle la présence d'amas de phytoplasmes dans les tissus libériens de la plante malade et celle de noyaux dans les cellules parenchymateuses des plantes infectées ou saines. L'immunofluorescence observée en lumière bleue (450 nm), est spécifique des amas de phytoplasmes. Elle ne permet pas la détection des noyaux et n'apparaît que dans la plante infectée. L'autofluorescence en lumière bleue (450 nm) des tissus libériens est liée à la présence de phytoplasmes dégénérés et à des altérations des parois du tube criblé. L'intensité de l'autofluorescence est toujours inférieure à celle de l'immunofluorescence.

Méthodes immunologiques pratiquées sur extraits de plantes ou d'insectes

Des tests ELISA utilisant des anticorps polyclonaux ont été réalisés avec succès dès 1983 pour identifier des phytoplasmes de façon spécifique [15]. Dans le cas des maladies de la vigne, les tests ELISA n'ont tout d'abord donné de résultats positifs que sur *C. roseus*. Les échecs enregistrés à partir de la vigne sont liés à la faible concentration des phytoplasmes dans cette espèce ainsi qu'au défaut d'accès des anticorps aux antigènes des phytoplasmes dans les conditions utilisées lors de l'extraction. Des détergents doivent être ajoutés aux tampons d'extraction afin de faciliter l'accès des anticorps aux sites antigéniques de la protéine membranaire du phytoplasme. L'ajout de ces détergents réduit vraisemblablement la sensibilité de la réaction, mais il est indispensable pour permettre l'accès de l'anti-

corps aux épitopes membranaires [26, 27]. La méthode ELISA a permis une étude comparative des phytoplasmes existants en pays tropicaux (figure 6) [28].

Méthodes moléculaires

Hybridation avec des sondes oligonucléotidiques (dot blot et Southern blot)

La méthode d'hybridation en *dot blot* utilisant un ADN cloné ou une sonde d'ARN complémentaire marqué est une des premières méthodes moléculaires utilisées pour déceler et différencier les phytoplasmes [29, 30]. La sensibilité de cette méthode est supérieure à celle de la méthode ELISA. Des hybridations en *Southern blot* faisant appel à un grand nombre de sondes, ont contribué à définir quelques groupes génétiques.

L'analyse électrophorétique du polymorphisme de tout ou partie de l'ADN génomique par la méthode d'hybridation *Southern blot* effectuée en sélectionnant des sondes clonées d'ADN, est particulièrement utile pour différencier des souches étroitement reliées, à l'intérieur de groupes ou de sous-groupes de phytoplasmes, jusqu'au niveau « isolat ». Elle a été appliquée aux phytoplasmes responsables de différentes maladies : jaunisse de la reine-marguerite (*aster yellows*, AY), maladie X (*western X*, WX), prolifération du pommier (*apple proliferation*, AP), flavescence dorée (FD) et récemment stolbur (STOL).

Polymerase Chain Reaction (PCR)

La faible concentration et l'inégale répartition des phytoplasmes dans l'hôte font que des méthodes extrêmement sensibles et fiables sont indispensables pour une détection de routine, en particulier dans les cas de plantes tolérantes porteuses. L'amplification de séquences spécifiques d'ADN par PCR s'est ici révélée la méthode de choix. La PCR peut aussi être effectuée à partir d'insectes-vecteurs [31, 32]. Des insectes fraîchement récoltés ou stockés à -20 °C peuvent être utilisés. Cependant les résultats obtenus sur insectes frais sont souvent supérieurs car des inhibiteurs pourraient être produits au cours de la conservation des insectes. En comparant, sur un même insecte sectionné en deux parties équivalentes, les résultats des méthodes ELISA et PCR, on constate une meilleure sensibilité de la PCR [32]. Plusieurs types de protocoles PCR peuvent être envisagés.

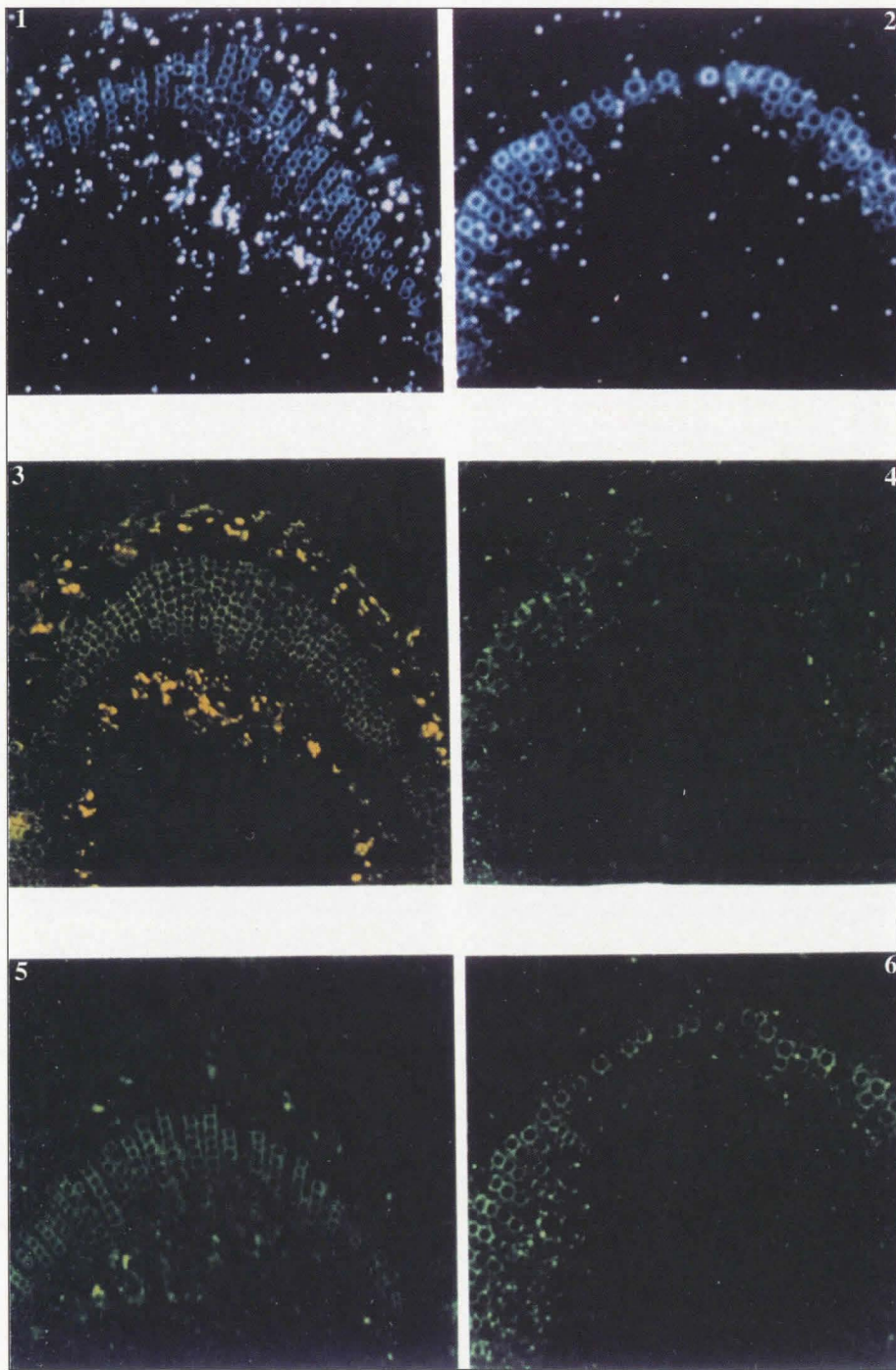


Figure 5. Méthodes histologiques de diagnostic des phytoplasmes : fluorescence de l'ADN, immunofluorescence et autofluorescence comparées (documents M.-T. Cousin, *et al.*).
 1, 3, 5 : pervenche de Madagascar infectée par le phytoplasme du stolbur ; 2, 4, 6 : témoin sain).
 1, 2. Fluorescence de l'ADN (DAPI) : fluorescence des phytoplasmes (1) et des noyaux (1 et 2).
 3, 4. Immunofluorescence : fluorescence des phytoplasmes seuls. (3) Absence de fluorescence des noyaux.
 5, 6. Autofluorescence.

Figure 5. Histological methods of diagnosis of the phytoplasmas: DNA fluorescence, immunofluorescence and primary fluorescence compared (documents MT Cousin, *et al.*). (1, 3, 5: periwinkle infected with the stolbur phytoplasma 2, 4, 6: healthy control).
 1, 2. DNA fluorescence (DAPI): phytoplasma (1) and nuclei (1 and 2) fluorescence.
 3, 4. Immunofluorescence: fluorescence of the phytoplasmas only. (3) No fluorescence of nuclei.
 5, 6. Primary fluorescence.

La PCR utilisant des amorces universelles obtenues à partir de séquences conservées des phytoplasmes, permet de déceler un large spectre de phytoplasmoses, tant chez la plante que chez l'insecte-vecteur. Les amorces P1-P7, qui amplifient l'ensemble de l'ADN r16S [33] et de l'espaceur 16S/23S [34] sont fréquemment utilisées.

La PCR peut utiliser des amorces spécifiques choisies dans des séquences non conservées de l'ADN ribosomique (ADN r16S, espaceur 16S/23S) ou dans des séquences obtenues à partir de fragments d'ADN clonés au hasard. Un exemple d'utilisation d'amorces spécifiques de l'AY, choisies dans les séquences non conservées de l'ADN r16S, est illustré sur la *figure 7*. Des amorces spécifiques non ribosomiques ont aussi été construites à partir des séquences des deux extrémités de fragments non ribosomiques clonés au hasard. Lorsque le fragment cloné est correctement sélectionné, les amorces sont spécifiques d'un groupe ou d'un sous-groupe de phytoplasmes [35-37].

La PCR gigogne ou *nested PCR*, qui fait appel à deux réactions d'amplifications successives, a pour but d'augmenter la sensibilité du diagnostic lorsque la détection est particulièrement difficile en raison de la faible concentration en phytoplasmes ou de la présence d'inhibiteurs dans les extraits soumis à la PCR [38, 39]. Elle a été utilisée dans le cas de phytoplasmes des essences ligneuses où la concentration en phytoplasmes est particulièrement faible. Le balai de sorcière du *populus nigra* cv *Italica* doit être décelé par cette méthode en Allemagne [40] alors qu'une seule PCR suffit à la détection du phytoplasme en France, dans des conditions identiques de préparation des échantillons et de réalisation de la PCR (*figure 7*) [41]. La PCR gigogne est souvent nécessaire pour déceler des phytoplasmes chez la vigne, et en particulier chez ses porte-greffes où les phytoplasmes sont très peu concentrés [42].

L'immunocapture PCR permet d'éviter les longs processus d'extraction de l'ADN des phytoplasmes, lorsqu'on dispose d'un antisérum spécifique de la maladie à l'étude. Le phytoplasme recherché est tout d'abord fixé par capture sur une plaque de microtitration, à l'aide d'un antisérum spécifique. Son ADN est ensuite utilisé dans une réaction PCR réalisée avec amorces universelles [43] ou spécifiques. Cette méthode

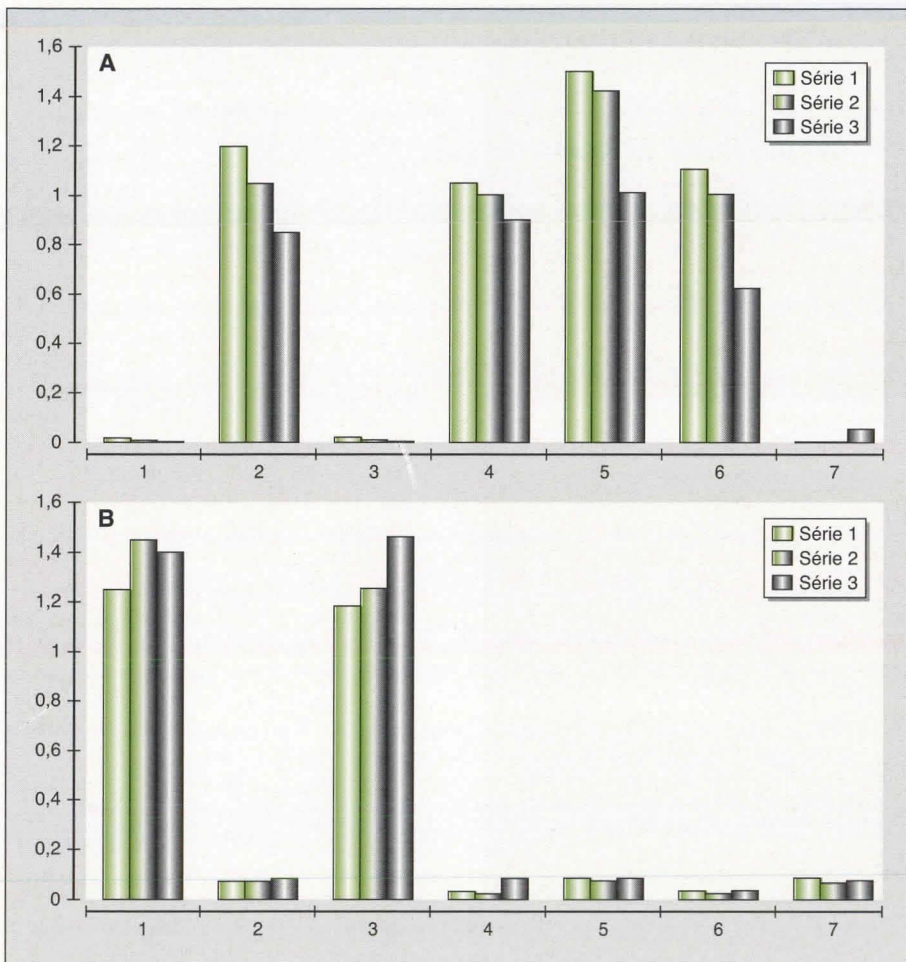


Figure 6. Test ELISA utilisé pour différencier des phytoplasmes appartenant au même groupe phylogénétique (documents M.-T. Cousin, *et al.*).

Figure 6. ELISA test used to differentiate phytoplasmas belonging to the same phylogenetic group (documents M.-T. Cousin, *et al.*).

permet une détection spécifique de maladies dans des cas particulièrement difficiles (prolifération du pommier et dépérissement du poirier). La méthode, applicable à la fois à la plante et à l'insecte, possède une spécificité élevée, une grande sensibilité et est d'exécution rapide.

La PCR quantitative consiste à comparer, sur un même gel d'électrophorèse, l'intensité des bandes de deux fragments d'ADN, amplifiés par les mêmes amorces, mais de taille différente, donc aisément repérables sur le gel. L'un d'eux (ADN cible à l'étude) entre en compétition avec le second (ADN compétiteur de concentration connue) pour l'utilisation des amorces. Les amorces permettant l'amplification de l'espaceur 16S/23S sont particulièrement adaptées à cette méthode, car il existe de grandes différences entre les

tailles des espaceurs suivant les phytoplasmes considérés. Des espaceurs 16S/23S ont été clonés et utilisés comme ADN cible, en particulier celui de l'AY (298bp) et de la maladie X (234pb). Ainsi le premier sera utilisé comme ADN compétiteur pour la quantification de l'ADN du second et réciproquement [44]. Une gamme de dilutions de l'ADN du compétiteur est utilisée en présence d'un volume constant de l'ADN cible. La dilution de l'ADN du compétiteur correspondant à l'obtention de deux bandes d'intensité équivalente, sera utilisée pour évaluer la quantité d'ADN cible. Cette méthode, très sensible, peut être appliquée à l'ensemble des phytoplasmes, à condition de choisir un compétiteur approprié. Elle permettra de suivre les fluctuations de la quantité des phytoplasmes au cours des saisons et dans les différents organes de la plante, ce qui est très utile en particulier dans le cas des essences ligneuses.

Taxonomie des phytoplasmes

La taxonomie des phytoplasmes est difficile en raison de l'absence de culture pure *in vitro* qui interdit l'accès à la génétique classique. Plusieurs classifications ont été proposées, fondées essen-



Figure 7. Polymerase Chain Reaction (PCR) (documents M.-T. Cousin, *et al.*). Amorces fAY-rAY spécifiques du groupe *aster yellows* qui amplifient un fragment d'ADN de 324 paires de bases. Électrophorèse en gel d'agarose à 1 %.

Figure 7. Polymerase Chain Reaction (PCR) (documents M.-T. Cousin, *et al.*). Primer pair fAY-rAY specific of the aster yellow group, amplifying a 324 base pair DNA fragment. 1% agarose gel electrophoresis.

1. Marqueur d'ADN.
 2. Isolat belge de la virescence de l'hortensia.
 3. Isolat français de la virescence de l'hortensia.
 4. Phyllosticta de la féverole (Soudan).
 5. Isolat allemand du balai de sorcière de *Populus alba*.
 6. Isolat français du balai de sorcière de *P. nigra* cv Italica.
 7. Isolat allemand du balai de sorcière de *P. tremula*.
 8. Isolat allemand du balai de sorcière de *P. nigra* cv Italica.
 9. Balai de sorcière de l'orme.
 10. Stolbur (France).
 11. Pseudo-stolbur C (Brésil).
 12. Pseudo-stolbur D (Brésil).
- 2, 3, 5, 6, 7 : présence d'amplifiats PCR ; 4, 8, 9, 10, 11, 12 : absence.

tiellement sur des comparaisons de l'ADN ribosomique.

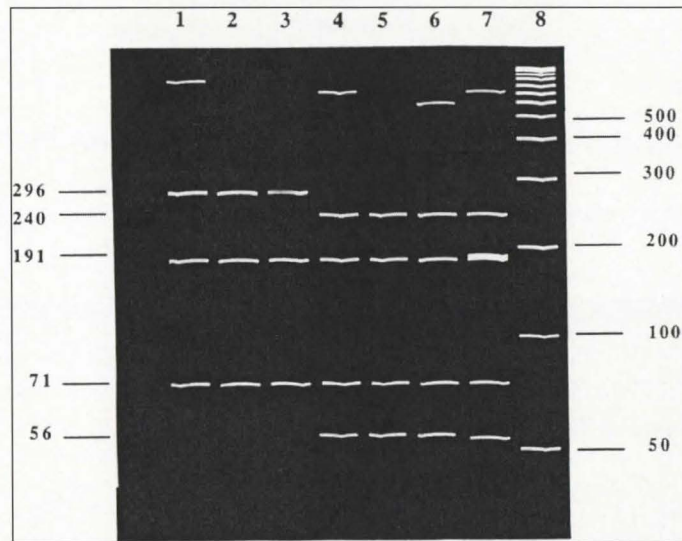
Méthodologies utilisées

Polymorphisme de longueur du fragment de restriction (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP)

Les phytoplasmes responsables des maladies des plantes ont tout d'abord été classés sur la base du polymorphisme de longueur des fragments générés par la digestion enzymatique avec des endonucléases (enzymes de restriction), de régions homologues de la fraction 16S de l'ADN ribosomique. La caractérisation d'un nouveau phytoplasme et son attribution à un groupe connu peut être

faite en comparant son profil RFLP à celui des groupes déjà identifiés. Un exemple d'utilisation de la méthode, permettant la caractérisation de deux groupes à partir de plusieurs isolats, est présenté en *figure 8*. La longueur des fragments de restriction, estimée sur l'électrophorégramme, est précisée par la connaissance des sites de coupures de l'enzyme utilisée et leur localisation sur la séquence des fragments amplifiés. Une cartographie des deux groupes a pu être établie.

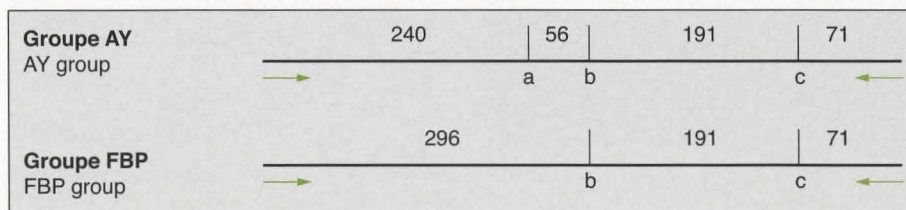
La répartition en sous-groupes du très vaste groupe de la jaunisse de la reine-marguerite (AY) a été effectuée par la confrontation des profils RFLP obtenus avec un grand nombre d'enzymes de restriction [45].



1. Phyllodie de la féverole sur *Vicia faba* (Soudan).
- 2 et 3. Phyllodie de la féverole sur *Catharanthus roseus* (Soudan).
- 4 et 7. Isolat français du balai de sorcière de *Populus nigra* cv *Italica*.
5. Germe fins du glaïeul.
6. Isolat français de la virescence de l'hortensia.
8. Marqueur d'ADN.

1, 2, 3 : trois bandes visibles (71, 191 et 296 pb).
4, 5, 6, 7 : quatre bandes visibles (56, 71, 191 et 240 bp).

Carte de restriction établie connaissant les séquences des fragments amplifiés et les sites de coupures d'Alu1.



Restriction map made using the known sequences of the amplified fragments and the sectioning sites of Alu1.

Analyse des séquences

La comparaison des séquences de la fraction 16S ou de l'espaceur intergénique 16S/23S de l'ADN ribosomique est une autre méthode proposée pour la classification des phytoplasmes [6]. On utilise soit l'alignement, soit le pourcentage d'homologie. Les résultats sont globalement en concordance avec ceux fournis par la méthode RFLP. Pour une classification plus fine en sous-groupes, les gènes codants pour la protéine ribosomique [45] ainsi que des séquences plus variables, telles que celles de l'ADN non ribosomique, peuvent aussi être utilisés et les résultats obtenus comparés avec ceux de la méthode RFLP faisant appel à un grand nombre d'enzymes de restriction.

Analyse de la mobilité électrophorétique des hétéroduplex (Heteroduplex Mobility Analysis, HMA)

Cette analyse mise au point sur les virus VIH (virus de l'immunodéficience humaine), permet la détection de légères modifications de nucléotides dans une séquence d'ADN. La méthode consiste à mélanger l'amplifiat PCR d'une souche à l'étude avec l'amplifiat homologue d'une souche de référence, obtenu avec les mêmes amorces. Les deux fragments d'ADN en mélange sont dénaturés 2 minutes à 95 °C afin de séparer les deux brins de chaque ADN, puis ils sont rapidement ré-hybridés à la température de la glace fondante. Les produits obtenus sont soumis à une électrophorèse en gel de polyacrylamide. Si les ADN des deux souches sont identiques, l'hybridation des quatre brins fils ne génère que des ADN double brin tous identiques « homoduplex », qui migrent dans le gel à l'emplacement qui correspond à la taille de leur séquence amplifiée par les amorces. Si les ADN des deux souches sont différents, on assiste à des erreurs d'appariement entre les ADN monobrin. Ces « hétéroduplex » contenant des boucles sont ralentis dans le gel de migration et forment des bandes en arrière de la bande « homoduplex ». La distance entre la bande « homoduplex » et les bandes « hétéroduplex » est proportionnelle au degré d'hétérogénéité entre les séquences à l'étude. La méthode s'est révélée sensible pour une différence d'un seul nucléotide [46]. Cette méthode, applicable de façon simultanée sur plusieurs isolats, peut être utilisée en taxonomie et convient aussi pour la caractérisation d'un phytoplasme si l'on dispose

d'une souche de référence à laquelle on se propose de comparer la souche étudiée [47].

Plusieurs isolats ont ainsi été traités par comparaison avec une souche de référence appartenant au groupe AY (figure 9). Les amorces P1-P7 ayant été utilisées, la bande « homoduplex » correspond à l'amplification de l'ADN r16S et de l'espaceur 16S/23S. Cette bande apparaît seule dans les isolats appartenant à la souche de référence AY. Sur l'isolat allemand du balai de sorcière de *Populus nigra* cv Italica (puits 10), la présence de bandes « hétéroduplex » situées à proximité immédiate de la bande « homoduplex », montre l'existence d'hétérogénéités nucléotidiques faibles entre cet isolat et l'isolat AY de référence. La distinction entre les souches française et allemande du balai de sorcière de *P. nigra* cv Italica correspond à des différences de virulence, la souche française étant plus virulente.

Principales maladies à phytoplasmes

Des phytoplasmes génétiquement très proches peuvent induire chez la plante des réactions différentes ; d'autres génétiquement éloignés sont à l'origine de maladies impossibles à distinguer par leurs symptômes [48]. Chez la tomate, des symptômes identiques à ceux du « stolbur », mais liés à différents groupes de phytoplasmes ont été signalés [49]. Dans le cas du maïs, des spiroplasmes ou des phytoplasmes du groupe AY peuvent être responsables du rabougrissement (*bushy stunt*). Les relations phylogénétiques entre phytoplasmes peuvent cependant éclairer les études épidémiologiques et la détection d'infections mixtes [48].

La description des principales maladies présentant un intérêt économique se fonde sur le dendrogramme de Seemüller [6], l'analyse des séquences de l'ADN r16S pouvant être considérée comme

une méthode standard. À l'intérieur du groupe très important de la jaunisse de la reine-marguerite (AY), les sous-groupes seront définis en fonction de critères permettant une différenciation plus fine [45], tels que l'analyse RFLP effectuée avec un très grand nombre d'enzymes de restriction et l'utilisation de régions moins conservées de l'ADN, comme les gènes de la protéine ribosomique. Les groupes présentés ci-après sont signalés (*) dans le tableau 2 et les maladies sont décrites en tenant compte des espèces végétales infectées et des zones géographiques concernées.

Groupes de la jaunisse de l'orme (*Elm yellows, EY*) et du frêne (*Ash yellows, AshY*)

Ce groupe contient la flavescence dorée de la vigne, différenciée de la jaunisse de l'orme *stricto sensu* par des méthodes sérologiques [50] et de biologie moléculaire [37, 51-53]. Il contient également le rabougrissement de la ronce (*Rubus*

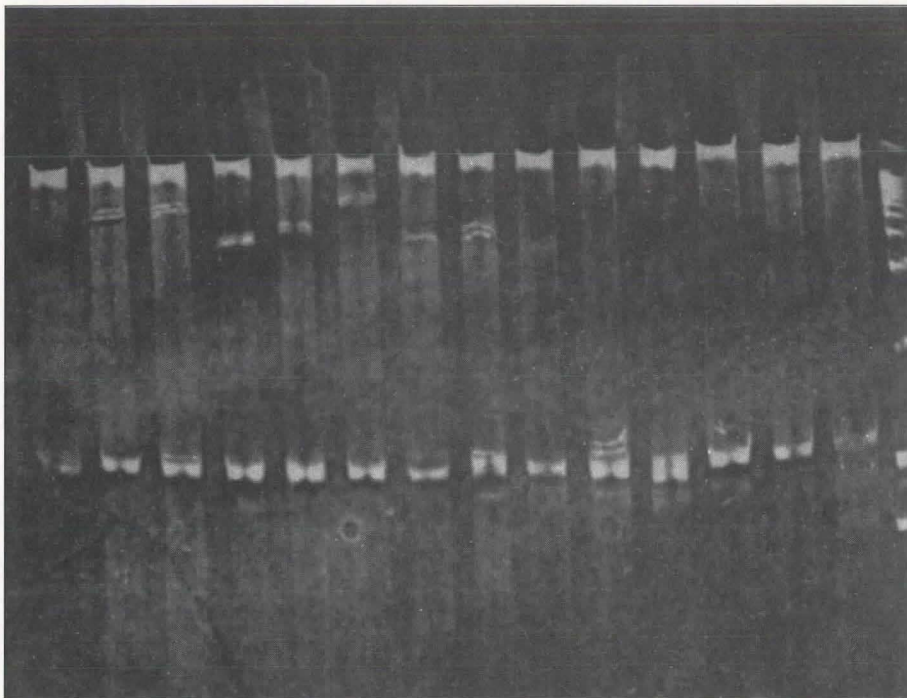


Figure 9. Heteroduplex Mobility Assay (HMA) (documents M.-T. Cousin, *et al.*). Amorces P1-P7 universelles amplifiant un fragment de 1,8 kpb correspondant à la fraction 16S et à l'espaceur 16S/23S. Souche de référence : Isolat français des germes fins du glaïeul, AY.

Isolats utilisés :

- 1, 9, 14. Isolats français des germes fins du glaïeul.
2. *Ulmus* WB (France).
3. Virescence de *Catharanthus roseus* (Soudan).
4. Phyllodie de la féverole (Soudan).
5. Tomato Big bud (Australie).
6. Pseudo-stolbur D (Brésil).
7. Pseudo-stolbur C (Brésil).
8. Stolbur (France).
10. Isolats allemands du balai de sorcière de *P. nigra* cv Italica.
11. Isolats allemands du balai de sorcière de *P. tremula*.
12. Isolats français du balai de sorcière de *P. alba*.
13. Isolats français du balai de sorcière de *P. nigra* cv Italica.
- 1, 9, 11, 12, 13, 14. Bande « homoduplex » seule (1, 8 kpb).
10. Bandes « hétéroduplex » localisées au dessus, à proximité immédiate de la bande « homoduplex ».
- 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8. Bandes « hétéroduplex » éloignées de la bande « homoduplex », situées dans la partie supérieure de l'électrophorogramme, à proximité du site de dépôt des échantillons.

Figure 9. Heteroduplex Mobility Assay (HMA) (documents M.-T. Cousin, *et al.*). P1-P7 universal primer pair amplifying a 1.8 kbp corresponding to the 16S and the spacer 16/23S DNA fragment. Reference strain: French isolate of *Gladiolus aster yellows*, AY.

Tableau 2**Groupes phylogénétiques de phytoplasmes placés suivant l'ordre figurant sur le dendrogramme établi par Seemüller *et al.* [6]**

* EY, Elm yellows, jaunisse de l'orme
CP, clover proliferation, prolifération du trèfle
* Ash Y, Ash yellows, jaunisse du frêne
Lf WB, Loofah witches' broom, balai de sorcière de <i>Luffa cylindrica</i>
* LY, Coconut lethal yellowing, jaunisse létale du cocotier
LTD, Tanzanian lethal decline, dépérissement létal du cocotier en Tanzanie
* BGWL, Bermuda grass white leaf, feuilles blanches de <i>Cynodon dactylon</i>
* SCWL, Sugar cane white leaf, feuilles blanches de la canne à sucre
Cir P, <i>Cirsium</i> phyllody, phyllodie de <i>Cirsium arvense</i>
PPWB, Pigeon pea witches' broom, balai de sorcière de <i>Cajanus cajan</i>
* FBP, Faba bean phyllody, phyllodie de la féverole
IAWB, Italian alfalfa witches' broom, isolat italien du balai de sorcière de la luzerne
* WX, Western X, maladie X
* AP, Apple proliferation, prolifération du pommier
Spa WB, <i>Spartium</i> witches' broom, balai de sorcière de <i>Spartium junceum</i>
BWB, Buckthorn witches' broom, balai de sorcière de <i>Rhamnus catharticus</i>
* AY, Aster yellows, jaunisse de la reine-marguerite
* STOL, Stolbur
IBS, Italian bindweed stolbur, isolat italien du stolbur du liseron
* AUSGY, Candidatus <i>phytoplasma australiense</i>

* Groupes décrits dans le texte.

Phylogenetic groups of phytoplasmas listed in the order of the dendrogramme established by Seemüller *et al.* [6]

stunt, RuS), la jaunisse de l'aulne (*Alder yellows*, ALY), la jaunisse du frêne et du lilas (*Ash yellows*, Ash Y) [53, 54].

Phytoplasmes des plantes en régions tropicales

Les maladies à phytoplasmes présentent une intensité particulière en régions tropicales, en raison des cycles ininterrompus des vecteurs et de la permanence de la végétation.

On rencontre les maladies suivantes :

– La jaunisse létale du cocotier (*Coconut lethal yellowing*, LY), l'une des menaces les plus graves pour *Cocos nucifera*, qui affecte l'Amérique centrale ainsi que l'Afrique occidentale et orientale. Trois sous-groupes correspondent à ces trois origines géographiques, avec des amorces spécifiques utilisées en particulier pour la recherche de vecteurs [55].

– Les feuilles blanches de *Cynodon dactylon* (*Bermuda grass white leaf*, BGWL) [56]. Un phytoplasme phylogénétiquement proche de celui du LY a été identifié sur cette espèce.

– Les feuilles blanches de la canne à sucre (*Sugar cane white leaf*, SCWL) en Thaïlande, dues à un phytoplasme phylogénétiquement proche de celui de la phyllodie de la féverole. En Afrique, le syndrome des feuilles jaunes de la canne à sucre serait lié à un phytoplasme appartenant au groupe de la maladie X (WX) [57].

– La phyllodie de la féverole (*Faba bean phyllody*, FBP). Ce groupe est fréquent en pays tropicaux sur féverole, patate douce, arachide, chanvre du Bengale (*Crotalaria juncea*), tomate, limier, sésame et papaye. Le Soudan (phyllodie de la féverole), la Thaïlande (phyllodie du

sésame, du soja et balai de sorcière de *Crotalaria juncea*) sont concernés avec des isolats sérologiquement différents (figure 6) [35]. Le rôle des adventices comme réservoir est particulièrement important en pays tropicaux. *Crotalaria saltiana* constitue le principal réservoir de la phyllodie de la féverole au Soudan [58]. *Catharanthus roseus* existe à l'état naturel dans ce pays où il est infecté par plusieurs maladies à phytoplasmes, en particulier par la phyllodie de la féverole. Le balai de sorcière du limier [59], Candidatus « *phytoplasma aurantifolia* », appartient au groupe de la phyllodie de la féverole.

Phytoplasmes infectant les arbres fruitier en régions tempérées (groupes WX et AP) [60]

En régions tempérées, les maladies à phytoplasmes des arbres fruitiers appartiennent à deux groupes principaux phylogénétiquement distincts, celui de la maladie X (*Western X*, WX) et celui de la prolifération du pommier (*Apple proliferation*, AP).

Le premier groupe rassemble les agents de la maladie X du cerisier, du pêcher, du prunier japonais et du balai de sorcière du noyer, il est apparenté au syndrome des feuilles jaunes de la canne à sucre en Afrique [57]. Le second se rapporte aux agents de la prolifération du pommier, du dépérissement du poirier (*Pear decline*, PD), des jaunisses européennes des fruits à noyaux (*European stone fruit yellows*, ESFY) qui affectent l'abricotier, le pêcher, l'amandier, le prunier européen et japonais et de l'enroulement chlorotique du pêcher (*Peach yellow leaf roll*, PYLR) [60].

Des phytoplasmes du groupe AY seraient à l'origine de maladies du châtaignier et de divers arbustes fruitiers.

Groupe de la jaunisse de la reine-marguerite (Aster yellows, AY) [61]

Des phytoplasmes du groupe AY ont été détectés dans de très nombreuses espèces, seuls ou en infections mixtes. Ce vaste groupe a été fractionné en sous-groupes [6, 45] (le sous-groupe B étant le plus souvent identifié en Europe), dont la caractérisation permet de définir des niches écologiques sur la base de leurs plantes-hôtes ou de leurs insectes-vecteurs. Souvent responsables de maladies épidémiques, ils entraînent des pertes sévères affectant les cultures florales, les

espèces de grande culture, les cultures légumières, le fraisier, les espèces ligneuses ornementales et forestières.

Sur plantes florales, les phytoplasmoses, souvent associées à des viroses qui contribuent à l'aggravation de la maladie, affectent de nombreuses dicotylédones florales. Deux souches, l'une française et l'autre belge, de la virescence de l'hortensia présentent des symptômes différents sur *Catharanthus roseus*, bien qu'appartenant au même groupe AY, sous-groupe B. Un phytoplasme de l'hortensia distinct de ceux précédemment identifiés, a été proposé par les chercheurs japonais à l'appellation « *Candidatus phytoplasma japonicum* » [62]. De nombreuses monocotylédones florales sont aussi affectées. Des phytoplasmes du groupe AY, sous-groupe B, ont été décrits dans le cas de la maladie des germes fins du glaïeul dont l'infection se traduit la première année par un jaunissement du feuillage et une altération des fleurs. Les bulbes récoltés sur des glaïeuls infectés forment, l'année suivante, de nombreuses pousses herbacées (« germes fins »).

La chloranthie du colza (*Rape phyllody*, RP) atteint également des cultures légumières (chou, chou frisé, radis, brocoli). Elle est due à des phytoplasmes du groupe AY, sous-groupe B, en Europe.

Les phytoplasmes du groupe AY ont été mis en évidence en microscopie électronique chez l'oignon en France, où ils causent une phyllodie des inflorescences [63], particulièrement grave pour la production des semences. Au Japon, des mutations apparues sur oignons infectés en serre affectent les séquences ainsi que le nombre de copies d'un plasmide mesurant 3,6 kpb ; elles ont été corrélées à des différences de pathogénicité des phytoplasmes [64]. Chez le poireau, le sous-groupe B a été mis en évidence en Italie et en République tchèque, soit seul, soit associé à des phytoplasmes du groupe « stolbur ». De nombreuses espèces légumières (carotte, pomme de terre, aubergine, patate douce, laitue) sont infectées par des phytoplasmes du groupe AY, sous-groupes A et B.

Chez le fraisier, des phytoplasmes [65] et des rickettsies [66] ont été décrits en microscopie électronique. Des phytoplasmes du groupe AY, sous-groupes A et C, ont été mis en évidence en Amérique. En Australie et en Nouvelle-Zélande, un phytoplasme correspondant à « *Candidatus phytoplasma australiense* » a été décrit [67]. Les maladies du fraisier

sont liées à des phytoplasmes phylogénétiquement différents selon le site géographique.

Les phytoplasmes du groupe AY peuvent également exister sur arbres et arbustes (cas du peuplier et du paulownia), seuls ou en association avec d'autres groupes. Le balai de sorcière de *Populus nigra* cv *Italica* (groupe AY, sous-groupe B) présente une virulence plus marquée en France qu'en Allemagne [41] liée au léger polymorphisme de séquences détecté en profils RFLP [40] ou en analyse de la mobilité électrophorétique des hétéroduplex (*Heteroduplex Mobility Analysis*, HMA) [47]. Des phytoplasmes du groupe AY, sous-groupe A, ont aussi été décrits au Canada sur *Populus sargentii* [68]. Chez le châtaignier et divers arbres à petits fruits, des phytoplasmes du groupe AY seraient à l'origine de certaines maladies.

Groupe « stolbur »

Le « stolbur » tire son nom d'une maladie des solanacées apparue en Europe de l'Est dans les années 40. L'isolat du phytoplasme (STOL) du poivron est le principal représentant du groupe. Des phytoplasmes appartenant au groupe « stolbur » ont été caractérisés à partir de tomates infectées mais des symptômes semblables peuvent être liés à d'autres groupes phylogénétiques [49]. Le « stolbur » a aussi été décrit sur céleri en France et en Italie alors qu'en Californie un phytoplasme du groupe AY, sous-groupe B, est principalement en cause [61].

Le « bois noir » de la vigne (BN), décrit tout d'abord dans l'est de la France et une maladie similaire « Vergilbungskrankheit » (VK) en Allemagne, sont des jaunisses de la vigne qui furent distinguées de la flavescence dorée (FD) par leur épidémiologie [11]. Les phytoplasmes associés à ces maladies appartiennent au groupe du « stolbur » [37] et un même vecteur (hémiptère cixiide, *Hyalesthes obsoletus*, connu pour transmettre le « stolbur » des solanacées) a été identifié sur vigne en France [31] et en Allemagne [69].

Le dépérissement jaune de *Lavandula* spp (*yellow decline of lavender*, LYD), détecté en microscopie électronique [70], est associé à un phytoplasme appartenant au groupe du « stolbur », identifié chez *Lavandula* spp [47, 49] et également chez l'insecte-vecteur *Hyalesthes obsoletus* Sign et plusieurs plantes adventices (*Convolvulus arvensis*, *Plantago cynop*,

Saturcia montana, *Calamintha nepetoïdes*, *Verbascum* sp, et *Cardaria draba*) [31], qui pourraient constituer des réservoirs potentiels de la maladie.

Le syndrome des basses richesses en sucre de la betterave (SBR) qui affecte cette espèce en Bourgogne est transmis par le cixiide *Pentastriridius beieri* Wagner [71]. Les maladies de type « stolbur » sont transmises préférentiellement par des cixiides.

Groupe d'Australie et de Nouvelle-Zélande (Groupe AUSGY, *Candidatus Phytoplasma australiense*) [72]

Ces phytoplasmes proches du « stolbur » causent une jaunisse de la vigne (*Australian Grapevine yellows*, AUSGY), le *dieback* du papayer, la jaunisse létale et la virescence du fraisier. Ce groupe contient aussi la maladie des feuilles jaunes du lin de Nouvelle-Zélande (*Phormium yellow leaf*, PYL), transmise par un cixiide *Oliarus atkinsoni*.

Taxonomie provisoire utilisant le terme *Candidatus phytoplasma*

Les séquences des ADN ribosomiques, les propriétés sérologiques et biologiques (spécificité de plantes-hôtes et de vecteurs) constituent des marqueurs permettant de caractériser un phytoplasme donné. Un système de taxonomie provisoire utilisant le terme « *Candidatus phytoplasma* » comme unité taxonomique de base a été adopté. Jusqu'ici, cinq « *Candidatus phytoplasma* » ont été proposés, dont les deux premiers sont inclus dans l'arbre phylogénétique établi par Seemüller *et al.* [6] que nous utilisons comme référence dans ce texte :

– *Candidatus phytoplasma aurantifolia*, responsable de la maladie du balai de sorcière du limier [59], appartenant au groupe de la phyllodie de la féverole (FBP).

– *Candidatus phytoplasma australiense* [72], responsable d'une jaunisse de la vigne, du *dieback* du papayer en Australie, d'une jaunisse du lin de Nouvelle-Zélande, d'une jaunisse létale et d'une virescence du fraisier en Australie et Nouvelle-Zélande [70], appartenant au groupe AUSGY.

– *Candidatus phytoplasma australasia* [72], responsable d'une maladie de la vigne en Australie, de l'aspect froissé (*yellow crinkle*) et de la mosaïque du

papayer, du gros bourgeon (*big bud*) de la tomate, du balai de sorcière de l'arachide et des petites feuilles de la patate douce en Australie et dans le Sud-Est de l'Asie.

– Candidatus *phytoplasma ulmi* subsp *chinensis*, causant une jaunisse létale du cerisier et le balai de sorcière du jujubier en Chine [73].

– Candidatus *phytoplasma japonicum*, responsable d'une virescence de l'hortensia au Japon [62].

Infections mixtes à phytoplasmes

Des infections simultanées par plusieurs phytoplasmes ont été signalées, avec des différences variables entre leurs ADN.

Polymorphisme d'ADN des phytoplasmes en infections mixtes

Si le polymorphisme est marqué, des amorces spécifiques de chaque phytoplasme peuvent être obtenues et leurs associations sont faciles à déceler. Chez des vignes du cépage Chardonnay présentant des symptômes de flavescence dorée, trois phytoplasmes différents ont été décelés [74]. Plusieurs hôtes susceptibles d'héberger des associations de phytoplasmes ont été répertoriés, notamment le trèfle et les arbres fruitiers où la présence simultanée de phytoplasmes « spécifiques » et « aspécifiques » a été signalée. Si le rôle pathogène des phytoplasmes « spécifiques » a été mis en évidence, il n'en est pas de même des phytoplasmes « aspécifiques » décelés par PCR gigogne. On note de grandes variations dans la virulence des phytoplasmes responsables de la prolifération du pommier (AP) et des jaunisses européennes des fruits à noyaux (ESFY). Dans les deux cas, des phytoplasmes « aspécifiques » ont été identifiés. Les variations de la virulence de ces phytoplasmoses seraient liées soit à des variations dans la virulence des souches « spécifiques », soit à la présence de souches « aspécifiques » qui affecteraient la virulence des souches « spécifiques ».

De légères différences dans les profils électrophorétiques peuvent aussi avoir une signification biologique et méritent

Summary

Phytoplasma and phytoplasma diseases: characteristics, symptoms and diagnosis

M.-T. Cousin, É. Boudon-Padieu

Phytoplasma were first characterized by biological properties common to those of some viruses, such as transmissibility by leafhopper vectors, multiplication in both insects and plants and localization in the phloem tissue of the host. Ultrastructural studies revealed the presence in the phloem of polymorphous bodies without cell walls, which were capable of moving through the sieve plates (figure 1). They were first named "mycoplasma-like organisms", but unlike animal mycoplasmas, they could not be cultured in a cell-free medium.

Phytoplasma DNA is characterized by a high A-T and low G-C content. A detailed study of the rRNA gene, chiefly the 16S fragment and the spacer located between 16S and 23S, revealed that they are unique microorganisms, which were named "phytoplasmas". Pulse field analysis of the entire *phytoplasma* genome has shown that they are among the smallest autonomous replicating microorganisms, the tiniest *phytoplasma* having a genome of less than 600 kbp. The position of the *phytoplasmas* among bacteria, mollicutes and viruses of the plants is mentioned in table 1. *Phytoplasmas* are phylogenetically closer to *Acholeplasma* and *Anaeroplasmata* than to animal mycoplasmas (figure 2).

Phytoplasma-diseased plants show teratological symptoms and symptoms of the vegetative parts of the plant (figure 3), leading, in some cases, to the recovery or the death of the host (figure 4). Techniques to maintain *phytoplasmas* in experimental host-plants, or tissue cultures, and ways of spreading in nature are presented.

Diagnostic methods include biological, histological (figure 5), immunological (figures 5 and 6) and molecular approaches (figure 7) in both host-plants and insect-vectors. Classification methods such as restriction fragment length polymorphism (Figure 8), heteroduplex mobility assay (figure 9), and base sequence analysis are discussed.

The main economically important diseases are described following the order established in the phylogenetic tree of Seemüller et al. (figure 10) [6]. They include: the "elm yellows" group, groups involved in tropical diseases or in European fruit tree diseases, the polyphagous "aster yellows" group affecting flowers, vegetables, field crops, woody ornamental plants and forest trees, and the "stolbur" group affecting *Solanaceae*, *Lavandula* spp, and sugar beet. A tentative taxonomy uses the name *Candidatus phytoplasma*.

Different *phytoplasmas* have frequently been detected in the same host with diverse levels of polymorphism. In some cases, they belonged to entirely different phylogenetic groups, in other ones to the same phylogenetic group with slightly different electrophoretic profiles. In some cases, the only heterogeneity was reported within the interoperon sequence.

Cahiers Agricultures 2001 ; 10 : 361-76.

d'être prises en compte dans des études épidémiologiques. Deux phytoplasmes appartenant au même groupe phylogénétique (phyllodie de la féverole, FBP) mais présentant de faibles différences dans leurs profils électrophorétiques, ont été décrits simultanément chez le papayer [75]. Les fleurs de papayer montrent, suivant les cas, une phyllodie ou une virescence. Il semble que la concentration de chacun des phytoplasmes présents en mélange intervienne dans l'apparition de ces différents symptômes.

Hétérogénéité de séquences entre les deux gènes ribosomiques 16S d'un même phytoplasme

Une hétérogénéité de séquence a été signalée entre les deux gènes ARN r16S du phytoplasme du lin de Nouvelle-Zélande (*Phormium yellow leaf* phytoplasma) [76] et du peuplier (*Populus tremula* and *alba* witches' broom phytoplasma) [40]. Ces hétérogénéités de séquences

Résumé

La connaissance des agents phytopathogènes responsables des maladies « de type jaunisse » a considérablement progressé au cours des dernières décennies. D'abord attribuées à des virus, puis à des micro-organismes de type mycoplasme, ces maladies sont désormais attribuées à des « phytoplasmes », dénomination qui rend compte du caractère unique de leur ADN ribosomique et de leur rapport à la plante-hôte. Les principales caractéristiques des phytoplasmes sont ici décrites, avec leurs méthodes de diagnostic et de caractérisation, en tenant compte des hôtes d'origine (plantes herbacées ou ligneuses, insectes-vecteurs) et des buts poursuivis (simple identification d'un phytoplasme, caractérisation d'une maladie donnée ou quantification des phytoplasmes au sein des différents organes de la plante). Les tentatives de classification et les méthodes à partir desquelles elles ont été établies sont mentionnées. Les principaux groupes de phytoplasmes et les maladies qu'ils provoquent sont classés en respectant l'ordre phylogénétique résultant de l'étude de leur ADN ribosomique effectuée par Seemüller *et al.* [6]. Une attention particulière est portée aux infections mixtes à phytoplasmes et en particulier aux phytoplasmes aspécifiques dont le rôle encore mal connu suscite actuellement l'intérêt des chercheurs.

interopérons sont plus fréquentes qu'on ne l'avait envisagé au départ. Si des souches de phytoplasmes sont étroitement reliées, il peut donc être intéressant de comparer les opérons équivalents [48].

Conclusion

La grande sensibilité des méthodes d'identification des phytoplasmes qui se sont développées au cours des années 1990 permet la détection aisée de ces agents. La détection ne représente cependant qu'une première étape qui doit être coordonnée avec l'étiologie des maladies en cause et avec leur transmission. Ainsi, l'identification par sérologie ou PCR d'un phytoplasme sera suivie d'essais de transmission qui peuvent seuls démontrer le caractère vecteur de l'insecte. Il sera alors possible de reproduire les symptômes par inoculation de plants sains, de diagnostiquer à nouveau le phytoplasme suspect dans les plantes inoculées et de conclure clairement sur l'étiologie de la maladie ■

Références

1. Doi Y, Teranaka M, Yora K, Asuyama H. Mycoplasma or PLT group-like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches' broom, aster yellows or paulownia witches' broom. *Ann Phytopathol Soc Japan* 1967 ; 3 : 259-66.

2. Razin S, Yogev D, Naot Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol Molec Biol Rev* 1998 ; 62 : 1094-156.

3. Neimark H, Kirkpatrick. BC. Isolation and characterization of full-length chromosomes from non-culturable plant-pathogenic mycoplasma-like organisms. *Mol Microbiol* 1993 ; 7 : 21-8.

4. Marcone C, Neimark H, Ragozzino A, Lauer U, Seemüller E. Chromosome sizes of phytoplasmas composing major phylogenetic groups and subgroups. *Phytopathology* 1999 ; 89 : 805-10.

5. Lim PO, Sears BB. 16S rRNA sequence indicates that plant-pathogenic mycoplasma-like organisms are evolutionary distinct from animal mycoplasmas. *J Bacteriol* 1989 ; 171 : 5901-6.

6. Seemüller E, Marcone C, Lauer U, Ragozzino A, Göschl M. Current status of molecular classification of the phytoplasmas. *J Plant Pathol* 1998 ; 80 : 3-26.

7. Caudwell A. Les phénomènes de rétablissement chez la flavescence dorée de la vigne. *Ann Epiphyties* 1961 ; 12 : 347-54.

8. Cousin MT. Witches' broom: a phytoplasma disease of poplar. In : Raychaudhuri SP, Maramoroch K, eds. *Forest trees and palms. Diseases and control*. Enfield (New Hampshire) : Science publishers, 1996 : 267-83.

9. Cousin MT, Roux J, Millet N, Michel MF. Maintenance of MLOs (Mycoplasma-like organisms) on *Populus alba* micropropagation. *J Phytopathol* 1990 ; 130 : 17-23.

10. Caudwell A, Larrue J, Tassart V, *et al.* Caractère porteur de la Flavescence dorée chez les vignes porte-greffes en particulier le 3309 C et le Fercal. *Agronomie* 1994 ; 14 : 83-94.

11. Boudon-Padieu E. Grapevine phytoplasmas. *First Internet Conference on Phytopathogenic Mollicutes* 1999 ; <http://www.uniud.it/phytoplasma/pap/boud8290.html>.

12. Cousin MT, Grison C, Decharme M. Étude comparée de plusieurs types de flétrissements de Solanacées. Polyphagie du Stolbur. *Histologie. Ann Epiphyties* 1968 ; 19 : 121-40.

13. Siddique ABM, Guthrie JN, Walsh KB, White DT, Scott PT. Histopathology and within-plant distribution of the phytoplasma associated with Australian papaya dieback. *Plant Disease* 1998 ; 82 : 1112-20.

14. Seemüller E. Investigations to demonstrate mycoplasma-like organisms in diseased plants by fluorescence microscopy. *Acta Horticulturae* 1976 ; 67 : 109-12.

15. Clark MF, Barbara DJ, Davies DL. Production and characteristics of antisera to *Spiroplasma citri* and clover phyllody associated antigens derived from plants. *Ann Appl Biol* 1983 ; 103 : 251-9.

16. Boudon-Padieu E, Larrue J, Caudwell A. ELISA and Dot-Blot detection of Flavescence dorée MLO in individual leafhopper vectors during latency and inoculative state. *Curr Microb* 1989 ; 19 : 357-64.

17. Clark MF, Morton A, Buss SL. Preparation of mycoplasma immunogens from plants and a comparison of polyclonal and monoclonal antibodies made against primula yellows MLO-associated antigens. *Ann Appl Biol* 1989 ; 103 : 251-9.

18. Cousin MT, Dafalla GA, Demazeau E, Theveu E, Grosclaude J. *In situ* detection of MLOs for *Solanaceae* Stolbur and faba bean phyllody by indirect immunofluorescence. *J Phytopathol* 1989 ; 124 : 71-9.

19. Schwartz Y, Boudon-Padieu E, Grange J, Meignoz R, Caudwell A. Obtention d'anticorps monoclonaux spécifiques de l'agent pathogène de type mycoplasme de la flavescence dorée de la vigne. *Res Microbiol* 1989 ; 140 : 311-24.

20. Fos A, Danet JL, Zreik L, Bové JM. Use of a monoclonal antibody to detect the stolbur mycoplasma-like organism in plants and insects and to identify a vector in France. *Plant Disease* 1992 ; 76 : 1092-6.

21. Lherminier J, Boudon-Padieu E, Meignoz R, Caudwell A, Milne RG. Immunological detection and localization of mycoplasma-like organisms (MLOs) in plants and insects by light and electron microscopy. In : Mendgen J, Lesemann DE, eds. *Electron microscopy and plant pathogens*. Berlin : Springer-Verlag, 1991 : 177-84.

22. Lherminier J, Courtois M, Caudwell A. Determination of the distribution and multiplication sites of Flavescence dorée Mycoplasma-like organisms in the plant host *Vicia faba* by ELISA and cytochemistry. *Physiol Mol Plant Pathol* 1994 ; 45 : 125-38.

23. Lefol C, Caudwell A, Lherminier J, Larrue J. Attachment of the Flavescence dorée Pathogen (MLO) to leafhopper vectors and other insects. *Ann Appl Biol* 1993 ; 123 : 611-22.

24. Seddas A, Meignoz R, Kuszala C, Boudon-Padieu E. Evidence for the physical integrity of Flavescence dorée phytoplasmas purified by immunoaffinity from infected plant or leafhoppers and the plant pathogenicity of phytoplasmas from leafhoppers. *Plant Pathol* 1995 ; 44 : 971-8.

25. Berg M, Davies DL, Clark MF, *et al.* Isolation of the gene encoding an immunodominant membrane protein of the apple proliferation phytoplasma, and expression and characterization of the gene product. *Microbiology* 1999 ; 145 : 1937-43.

26. Caudwell A, Kuszala C. Mise au point d'un test ELISA sur les tissus de vignes atteintes de Flavescence dorée. *Res Microbiol* 1992 ; 143 : 791-806.

27. Kuszala C. Influence du milieu d'extraction sur la détection du bois noir et de la flavescence dorée de la vigne, par des anticorps poly et monoclonaux dirigés contre les phytoplasmes du stolbur et de la flavescence dorée. *Agronomie* 1996 ; 16 : 355-65.
28. Saeed E, Sarindu N, Davies DL, Clark MF, Roux J, Cousin MT. Use of polyclonal antibodies to identify Mycoplasma-like organisms (MLOs) from the Sudan and from Thailand. *J Phytopathology* 1994 ; 142 : 345-9.
29. Kirkpatrick BC, Stenger DC, Morris TJ, Purcell AH. Cloning and detection of DNA from a nonculturable plant pathogenic mycoplasma-like organism. *Science* 1987 ; 236 : 197-200.
30. Daire X, Boudon-Padiou E, Bervillé A, Schneider B, Caudwell A. Cloned DNA probes for detection of grapevine Flavescence dorée mycoplasma-like organism (MLO). *Ann Appl Biol* 1992 ; 121 : 95-103.
31. Sforza R, Clair D, Daire X, Larrue J, Boudon-Padiou E. The role of *Hyalesthes obsoletus* (Hemiptera: Cixiidae) in the occurrence of Bois noir of grapevines in France. *J Phytopathol* 1998 ; 146 : 549-56.
32. Weber A, Maixner M. Survey of populations of the planthopper *Hyalesthes obsoletus* Sign. (*Auchenorrhyncha, Cixiidae*) for infection with the phytoplasma causing grapevine yellows in Germany. *J Appl Ent* 1998 ; 122 : 375-81.
33. Deng S, Hiruki C. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and non-culturable mollicutes. *J Microbiol Meth* 1991 ; 14 : 53-61.
34. Smart CD, Schneider B, Blomquist CL, et al. Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of the 16S-23S rRNA spacer region. *Appl Environ Microbiol* 1996 ; 62 : 2988-93.
35. Saeed E, Seemüller E, Schneider B, et al. Molecular cloning, detection of chromosomal DNA of the mycoplasma-like organism (MLO) associated with faba bean (*Vicia faba* L.) phyllody by southern blot hybridization and the polymerase chain reaction (PCR). *J Phytopathology* 1994 ; 142 : 97-106.
36. Jarausch W, Saillard C, Dosba F, Bové JM. Differentiation of mycoplasma-like organisms (MLOs) in European fruit trees by PCR using specific primers derived from the sequence of a chromosomal fragment of the apple proliferation MLO. *Appl Environ Microbiol* 1994 ; 60 : 2916-20.
37. Daire X, Clair D, Boudon-Padiou E. Detection and differentiation of grapevine yellows phytoplasmas belonging to the elm yellows group and to the stolbur subgroup by PCR amplification of non-ribosomal DNA. *Eur J Plant Pathol* 1997 ; 103 : 507-14.
38. Lee IM, Gundersen DE, Hammond RW, Davis RE. 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* 1994 ; 84 : 559-66.
39. Gundersen DE, Lee IM. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopath Medit* 1996 ; 35 : 114-51.
40. Berges R, Cousin MT, Roux J, Maürer R, Seemüller E. Detection of phytoplasma infections in declining *Populus nigra* cv *Italica* trees and molecular differentiation of the aster yellows phytoplasmas identified in various *Populus* species. *Eur J For Path* 1997 ; 27 : 33-43.
41. Cousin MT, Berges R, Roux J, Moreau JP, Hiruki C, Seemüller E. *Populus nigra* cv *Italica* decline in France, variability of the phytoplasma responsible for the disease in Europe, results and perspectives. *Proceedings of the International Symposium on Urban Tree Health. Acta Horticulturae* 1999 ; 496 : 77-86.
42. Daire X, Clair D, Larrue J, Boudon-Padiou E, Caudwell A. Diversity among Mycoplasma-like organisms inducing grapevine yellows in France. *Vitis* 1993 ; 32 : 159-63.
43. Rajan J, Clark MF. Detection of apple proliferation and other MLOs by immuno-capture PCR (IC-PCR). *Acta Hort* 1995 ; 386 : 511-4.
44. Pressaco L, Firrao G. A general competitive polymerase chain reaction assay for quantification of phytoplasmas. *First Internet Conference on Phytopathogenic Mollicutes* 1999 ; <http://www.iniuud.it/phytoplasma/pap/pres7000.html>.
45. Lee IM, Gundersen-Rindal DE, Davis RE, Bartoszyk IM. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *Int J Syst Bacteriol* 1998 ; 48 : 1153-69.
46. Wang K, Hiruki C. Rapid detection of a single-base-pair mutation in phytoplasmal conserved genes by DNA heteroduplex mobility assay (HMA). *Proceedings of the Japan Academy Ser B* 1999 ; 75 : 259-62.
47. Cousin MT, Roux J, Boudon-Padiou E, Berges R, Seemüller E, Hiruki C. Use of Heteroduplex Mobility Analysis (HMA) for differentiating phytoplasma isolates causing Witches' broom disease on *Populus nigra* cv *Italica* and stolbur or Big bud on tomato. *J Phytopathol* 1998 ; 146 : 97-102.
48. Davis RE, Sinclair WA. Phytoplasma Identity and Disease Etiology. *Phytopathology* 1998 ; 88 : 1372-6.
49. Boudon-Padiou E, Cousin MT, Daire X, Hiruki C, Kuszala C, Roux J. Molecular and serological characterization of phytoplasma isolates inducing tomato stolbur symptoms in tomato. *IOM Letters* 1996 ; 4 : 167-8.
50. Seddas A, Meignoz R, Daire X, Boudon-Padiou E. Generation and characterization of monoclonal antibodies to Flavescence dorée phytoplasma; serological relationships and differences in electroblot immunoassay profiles of Flavescence dorée and Elm yellows phytoplasmas. *Eur J Plant Pathol* 1996 ; 102 : 757-64.
51. Clair D, Frelet A, Aubert G, Collin E, Boudon-Padiou E. Improved detection of Flavescence dorée and related phytoplasma in the elm yellows group in difficult material, with specific PCR primers that amplify a variable non-ribosomal DNA fragment. *13th conference of the ICVG. Adelaide. SA. Australia*. Extended abstracts. 12-17 March 2000 : 101-2.
52. Angelini A, Clair D, Borgo M, Bertaccini A, Boudon-Padiou E. Flavescence dorée in France and Italy. Occurrence of closely related phytoplasma isolates and their near relationship to Palatinate grapevine yellows and an alder yellows phytoplasmas. *Vitis* 2001 ; 40 : 79-86.
53. Griffiths HM, Sinclair WA, Boudon-Padiou E, et al. Phytoplasmas associated with elm yellows: molecular variability and differentiation from related organisms. *Plant Disease* 1999 ; 83 : 1101-4.
54. Sinclair WA, Griffiths HM, Davis RE. Ash yellows, and lilac witches' broom: phytoplasmal diseases of concern in Forestry and Horticulture. *Plant Disease* 1996 ; 80 : 469-75.
55. Tymon AM, Jones P, Harrison NA. Phylogenetic relationships of coconut phytoplasmas and the development of specific oligonucleotide PCR primers. *Ann Appl Biol* 1998 ; 132 : 437-52.
56. Dafalla GA, Cousin MT. Fluorescence and electron microscopy of *Cynodon dactylon* affected with a white leaf disease in the Sudan. *J Phytopathol* 1988 ; 122 : 25-34.
57. Cronje CPR, Tymon AM, Jones P, Bailey RA. Association of a phytoplasma with a yellow leaf syndrome of sugarcane in Africa. *Ann Appl Biol* 1998 ; 133 : 177-86.
58. Dafalla GA, Cousin MT. Phyllody of faba bean in the Sudan. I. Progress of symptom expression, host range and transmission to *Catharanthus roseus* through dodder. *Agronomie* 8, 5 : 441-9. II. Detection of the disease by light microscopy: fluorescence, bright field, interference contrast and observation of MLOs by transmission electron microscopy. *Agronomie* 1988 ; 8 : 495-502.
59. Zreik L, Carle P, Bové JM, Garnier M. Characterization of the mycoplasma-like organism associated with witches' broom disease of lime and proposition of a *Candidatus* taxon for the organism, *Candidatus phytoplasma aurantifolia*. *Intern J Syst Bacteriol* 1995 ; 45 : 449-53.
60. Seemüller E. On some problems in temperate fruit tree phytoplasma research. *First Internet Conference on Phytopathogenic Mollicutes* 1999 ; <http://www.iniuud.it/phytoplasma/pap/seem2700.html>.
61. Bertaccini A. Phytoplasmas and yellows diseases. *First Internet Conference on Phytopathogenic Mollicutes* 1999 ; <http://www.iniuud.it/phytoplasma/pap/bert8310.html>.
62. Sawayanagi T, Horikoshi N, Kanehira T, et al. "*Candidatus phytoplasma japonicum*", a new phytoplasma taxon associated with Japanese *Hydrangea* phyllody. *Intern J of Systematic Bacteriology* 1999 ; 49 : 1275-85.
63. Cousin MT, Schweiguth B, Favre-Amiot A, et al. Contribution à l'étude du cycle des mycoplasmes chez les végétaux à l'aide d'observations effectuées sur Oignon atteint d'Aster Yellows. *C R Acad Sci* 1971 ; 272 : 830-3.
64. Kuboyama T, Huang CC, Lu X, et al. A plasmid isolated from phytopathogenic onion yellows phytoplasma and its heterogeneity in the pathogenic mutant. *Mol Pl Microb Interact* 1998 ; 11 : 1031-7.
65. Cousin MT, Moreau JP, Favre-Amiot A, Staron T. Sur la présence de particules de type Mycoplasmes chez les fraisiers atteints de la maladie des « Pétales verts ». Comparaison avec la phyllodie du trèfle. Polymorphisme des microorganismes. *Ann Phytopathol* 1970 ; 2 : 443-53.
66. Greber RS, Gowanlock DH. Rickettsia-like and mycoplasma-like organisms associated with two yellows-type diseases of strawberries in Queensland. *Australian Journal of Agricultural Research* 1979 ; 30 : 1101-9.
67. Padovan AC, Persley D, Gibb K. Strawberry lethal yellows and strawberry green petal. One phytoplasma, two symptom types. *First Internet Conference on Phytopathogenic Mollicutes* 1999 ; <http://www.iniuud.it/phytoplasma/pap/pado2070.html>.
68. Hiruki C, Wang K, Cousin MT. Molecular detection and identification of a cotton wood poplar witches' broom associated phytoplasma in southern Alberta. *Plant pathol* (in press).
69. Maixner M, Ahrens U, Seemüller E. Detection of the German grapevine yellows (Vergilbungskrankheit) MLO in grapevine, alternative hosts and a vector by a specific PCR procedure. *Europ J Plant Pathology* 1995 ; 101 : 241-50.

70. Cousin MT, Moreau JP, Kartha KK, Staron T, Faivre-Amiot A. Étude ultrastructurale des mycoplasmes infectant les tubes criblés de lavandins « Abrial » atteints de « Dépérissement jaune ». *Ann Phytopathol* 1971 ; 3 : 243-50.

71. Gatineau F, Larrue J, Clair D, Lorton F, Richard-Molard M, Boudon-Padieu E. A new natural planthopper vector of stolbur phytoplasma in the genus *Pentastiridius* (Hemiptera: Cixiidae). *Eur J Plant Pathol* 2001 ; 107 : 263-71.

72. White DT, Blackhall LL, Scott PT, Walsh KB. Phylogenetic positions of phytoplasmas associated with dieback, yellow crinkle and mosaic

diseases of papaya, and their proposed inclusion in "*Candidatus Phytoplasma australiense*" and a new taxon "*Candidatus Phytoplasma australasia*". *Intern J of Systematic Bacteriology* 1998 ; 48 : 941-51.

73. Zhu SF, Lee IM, Gundersen DE, Zhang CL, Hadidi A. Phytoplasmas associated with cherry lethal yellows and jujube witches' broom in China represent a new *Candidatus* subspecies level taxon. *IOM letters* 1996 ; 4 : 218.

74. Alma A, Davis RE, Vibio M, *et al.* Mixed infection of grapevines in northern Italy by phytoplasmas including 16S rRNA RFLP subgroup

16Srl-B strains previously unreported in this host. *Plant Dis* 1996 ; 80 : 418-21.

75. Padovan AC, Gibb KS, De La Rue SJ. Phytoplasma Variability in a Papaya Plot. In : *Abstr Eleventh Biennial Conference of the Australasian Plant Pathology Societ* Perth. 29 Sept.-2 Oct. 1997 ; 214 p.

76. Liefing LW, Andersen MT, Beever RE, Gardner RC, Forster RLS. Sequence heterogeneity in the two 16S rRNA genes of *Phormium* yellow leaf phytoplasma. *Appl Environ Microbiol* 1996 ; 62 : 3133-9.