

Phytoplasmes et phytoplasmoses : vecteurs, méthodes de lutte et thèmes de recherche

Marie-Thérèse Cousin, Élisabeth Boudon-Padieu

Vecteurs de phytoplasmes

Tous les vecteurs de phytoplasmes sont des insectes piqueurs-suceurs de l'ordre des Hémiptères qui prélèvent la sève dans les tubes criblés du liber. Les études de phylogénie moléculaire permettent de distinguer les Hémiptères Sternorrhynques (psylles, aleurodes et pucerons) et les Euhémiptères comportant les Cicadomorpes (cigales et cicadelles) et les Néohémiptères (Fulgoromorphes et Hétéroptères [1] (figure 1). Sont vecteurs de phytoplasmes : les cicadelles ou *leafhoppers* (en particulier *Jassidae*), les Fulgoromorphes, *planthoppers* (en particulier *Cixiidae*) et les *Psyllidae* (psylles).

teur, le jasside *Macrosteles fascifrons* [2]. Le rôle du jasside, *Scaphoideus littoralis* (ultérieurement nommé *S. titanus*) était mentionné en France [3] comme vecteur de la « flavescence dorée » de la vigne. Les cycles des jassides, *Euscelis plebejus* [4] et *Aphrodes bicinctus* [5] (figure 2, gauche), vecteurs de la « phyllodie du trèfle blanc » furent décrits, ainsi que leur mode de piqûre, dans les tubes criblés du phloème [6] (figure 2, droite).

La majorité des vecteurs de phytoplasmes actuellement identifiés appartient au groupe des Jassides et l'élevage de plusieurs d'entre eux a pu être réalisé. Aucune transmission transovarienne de phytoplasmes phytopathogènes n'a été mise en évidence en ce qui les concerne. Des phytoplasmes ont bien été observés dans des

œufs, des nymphes et des adultes de *S. titanus* dans des élevages maintenus sur plantes saines (ce qui suggère une possible transmission transovarienne), mais ils diffèrent de ceux qui sont responsables de la « flavescence dorée » de la vigne et ne présentent pas de lien apparent avec la maladie [7].

Cixiidae

Certains « cixiides » sont vecteurs de maladies à phytoplasmes. Les femelles, toujours plus grandes que les mâles, présentent à l'extrémité de leur abdomen, une plaque cirière qui sécrète des cires blanchâtres permettant de les reconnaître facilement.

Hyalesthes obsoletus Sign, décrit dès 1948 comme vecteur du « stolbur » des solana-

Les groupes de vecteurs : *Jassidae*, *Cixiidae*, *Psyllidae*

Jassidae (figure 2)

Dès 1952, la multiplication de l'agent pathogène de la « jaunisse de l'aster » était signalée à la fois chez la plante et son vec-

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

É. Boudon-Padieu : Institut national de la recherche agronomique, Laboratoire de phytoparasitologie, Équipe phytoplasmes, BP 86510, 21065 Dijon Cedex, France.

Tirés à part : É. Boudon-Padieu

Thème : Protection phytosanitaire.

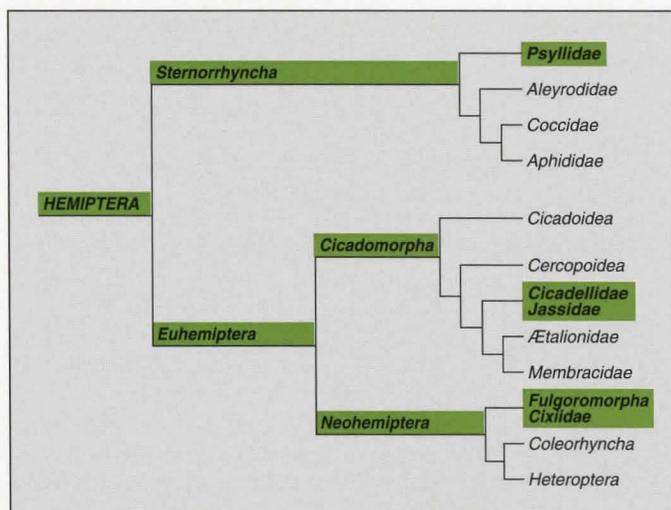


Figure 1. Phylogénie des *Hemiptera* (documents B.C. Campbell). Les vecteurs de phytoplasmes sont signalés en vert.

Figure 1. Phylogeny of *Hemiptera* (documents B.C. Campbell).

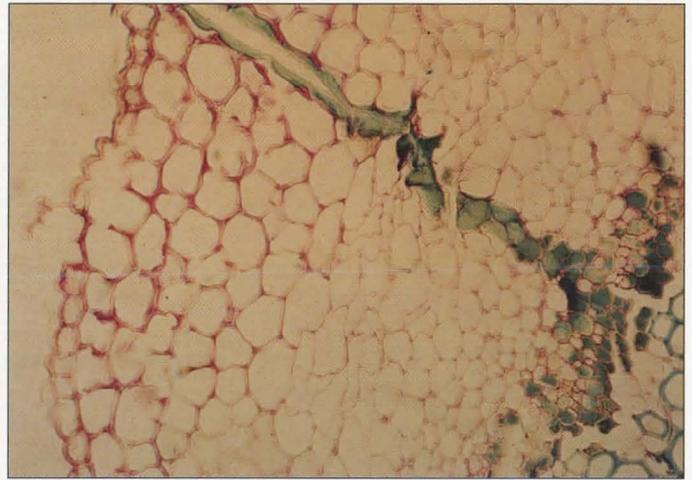


Figure 2. *Aphrodes bicinctus*, jasside vecteur de la phyllodie du trèfle et gaine sétale laissée par sa piqure atteignant les tissus libériens de la plante-hôte (documents J.-P. Moreau).

Figure 2. *Aphrodes bicinctus*, jassid vector of the clover phyllody and trace of its bite reaching the phloem of the host plant (documents J.-P. Moreau).

cées [8], est présent autour du bassin méditerranéen, en Allemagne et en Alsace et fut identifié dès 1968 dans le Midi de la France [9]. Il transmet des phytoplasmes du groupe « stolbur » responsables, chez la vigne du « bois noir » en France [10] et de son homologue la maladie dénommée « Vergilbungskrankheit » en Allemagne [11], chez la lavande et le lavandin, du « dépérissement jaune » en France. Le cixiide *Oliarius* spp a aussi été décrit comme vecteur du « stolbur » des solanacées [9] et il n'est pas exclu que le « bois noir » et la « Vergilbungskrankheit » puissent être transmis par d'autres vecteurs encore inconnus.

Récemment, un cixiide appartenant au genre *Pentastiridius* [12] a été décrit en France sur la betterave, où il transmet le « syndrome des basses richesses » (SBR), maladie associée à un phytoplasme du groupe « stolbur ».

Un autre cixiide, *Oliarius atkinsoni* Myers, transmet la « maladie des feuilles jaunes du lin de Nouvelle-Zélande, *Phormium yellow leaf* » (PYL), une phytoplasme dont l'agent pathogène appartient à un sous-groupe du groupe « stolbur ». Ce cixiide a été rencontré sur vignes en Australie où son rôle de vecteur n'a pas été démontré [13]. Enfin le fulgoromorphe *Myndus crudus* Van Duzee transmet la « jaunisse du palmier à huile ».

Psyllidae

Le rôle des psylles dans la transmission du « dépérissement du poirier, *pear decline* » (PD), est mentionné dès 1964 [14], avant la découverte des phytoplasmes, alors que la maladie était considérée comme d'origine virale. Puis *Cacopsylla pyri* (anciennement *Psylla pyri*) en France [15], *C. pyricola* en Angleterre [16] sont signalés comme vecteurs de la maladie et les phytoplasmes mis en évidence par PCR en utilisant des amorces spécifiques de ce groupe [17]. Enfin *C. melanoneura* [18] et *C. costalis* [19] sont décrits comme vecteurs de la « prolifération du pommier » en Italie.

Le rôle de *C. pruni* dans la transmission de la « jaunisse européenne des fruits à noyaux, *European stone fruit yellows* » (ESFY) a aussi été mentionné [20]. La vécition est spécifique, puisque cette espèce ne transmet pas le phytoplasme aux poiriers ou aux pommiers, tandis que réciproquement, *C. pyri*, vecteur du « dépérissement du poirier », ne transmet pas le phytoplasme aux *Prunus*. La vécition représente un paramètre important dans la séparation des sous-groupes de phytoplasmes. Le rôle des psylles est aussi mentionné dans des cas de transmission de phytoplasmes à des plantes herbacées. Dès 1974, la transmission de la « prolifération de la carotte » par *Trioza nigricornis* est signalée en France [21], où

des phytoplasmes et des rickettsies ont été observés simultanément au microscope électronique [22].

Cycles des vecteurs de phytoplasmes dans la nature

Scaphoideus titanus, jasside ampélophage, seul vecteur de la « flavescence dorée » de la vigne, n'effectue qu'un cycle annuel. Il peut être observé à la fois sur vignes sauvages et cultivées, mais c'est essentiellement sur ces dernières qu'il effectue son cycle en France. La vigne est sa seule plante-hôte, ce qui contribue au caractère épidémique de la maladie. Les éclosions ont lieu vers la mi-mai, après quoi les cinq stades larvaires se succèdent rapidement (environ 7 à 10 jours pour chaque stade). Les larves ainsi que les adultes ailés acquièrent le phytoplasme au début du printemps alors qu'apparaissent les jeunes pousses de vigne à croissance rapide. Une période d'incubation de quatre semaines est nécessaire avant que le vecteur ne soit capable de transmettre la maladie. La capacité de vécition subsiste jusqu'à la mort de l'insecte en septembre.

Plusieurs jassides, dont *Euscelis plebejus* et *Aphrodes bicinctus*, sont responsables de la transmission de la « phyllodie du

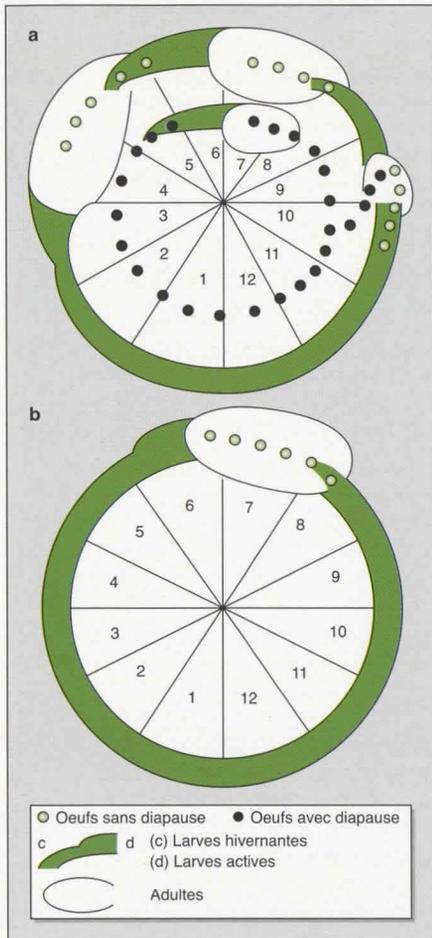


Figure 3. Cycles biologiques d'*Euscelis plebejus* (a) et de *Hyalesthes obsoletus* (b) (documents J.-P. Moreau (a) et R. Sforza (b)).

Janvier (1) ; février (2) ; mars (3) ; avril (4) ; mai (5) ; juin (6) ; juillet (7) ; août (8) ; septembre (9) ; octobre (10) ; novembre (11) ; décembre (12).

Figure 3. Biological cycles of *Euscelis plebejus* (a) and of *Hyalesthes obsoletus* (b) (documents J.-P. Moreau (a) et R. Sforza (b)).

(a) *Euscelis plebejus*

Cercle externe
 (10, 11, 12, 1, 2) Larves hivernantes.
 (3) Reprise d'activité des larves hivernantes.
 (4, 5) Première génération d'adultes, ponte d'œufs sans diapause.
 (6) Larves actives issues d'œufs sans diapause.
 (7, 8) Deuxième génération d'adultes, ponte d'œufs sans diapause, larves actives.
 (9) Troisième génération d'adultes, ponte d'œufs avec et sans diapause.

Cercle interne

(9, 10, 11, 12, 1, 2, 3, 4, 5) Œufs d'hiver avec diapause.
 (6) Larves actives issus des œufs avec diapause.
 (7, 8) Adultes apparus à la même époque que la deuxième génération d'adultes (cercle externe).

(b) *Hyalesthes obsoletus*

(8, 9, 10, 11, 12, 1, 2, 3, 4, 5) Larves hivernantes sur les racines des plantes-hôtes.
 (6, 7) Sortie, vol des adultes, copulation, ponte d'œufs sans diapause.
 (8) Fin de la vie adulte, premiers stades larvaires.

trèfle». Ils effectuent une grande partie de leur cycle sur trèfle, mais peuvent aussi coloniser d'autres plantes. Leur mode d'hibernation varie selon les régions concernées. Ainsi, dans l'Ouest de la France (climat océanique), *E. plebejus* hiverne principalement sous forme de larves capables de s'infecter avant hibernation et de transmettre la maladie dès leur reprise d'activité au printemps, car la période d'incubation du phytoplasme se trouve alors achevée (figure 3a, cercle externe). Dans des climats plus continentaux, *E. plebejus* hiverne sous forme d'œufs incapables de conserver le phytoplasme. Les larves devront, au printemps, acquérir le phytoplasme sur des hôtes végétaux et ne pourront le transmettre qu'après achèvement de la période d'incubation (figure 3a, cercle interne).

Le cixiide *Hyalesthes obsoletus*, vecteur des maladies de la vigne, « bois noir » en France et « Vergilbungskrankheit » en Allemagne ainsi que du « dépérissement de la lavande et du lavandin » en France, est présent dans des zones où le jasside

vecteur de la « flavescence dorée » de la vigne *S. titanus* est absent. *H. obsoletus* ne se développe pas sur les feuilles et les pousses, mais dépose ses œufs sur les racines de ses plantes-hôtes, comme d'autres membres de la famille des cixiides. Les larves du premier stade, qui apparaissent en été, demeurent sur les racines, tandis que les larves des deuxième et troisième stades s'enfoncent plus profondément dans le sol et sont protégées du froid hivernal. Elles acquièrent les phytoplasmes sur ces hôtes et seront ensuite capables de les transmettre au cours de la phase adulte et même sous forme de larves du cinquième stade. *H. obsoletus* est donc peu sensible aux conditions climatiques hivernales. Sa phase aérienne, sur les feuilles et les pousses de plantes diverses, limitée aux adultes, est relativement brève : six semaines environ, de la mi-juin à la fin juillet (figure 3b). On le trouve alors sur les vignes qu'il peut infecter. *H. obsoletus* est présent principalement sur le pourtour méditerranéen (France et Israël)

mais non en Espagne. C'est un vecteur polyphage qui affectionne particulièrement les plantes herbacées, liseron et autres plantes adventices situées à l'extérieur des parcelles de vigne. Son habitat principal se situe dans des terres non cultivées laissées à l'abandon, des friches de bordures, des couverts herbeux de cultures fruitières, des jeunes semis de lavandes. Tous ces sites possèdent une structure aérée du sol permettant aux larves de se développer et de se déplacer sous terre sur les racines des plantes-hôtes. Il ne pique la vigne que de façon occasionnelle lors de sa recherche de nourriture et, lorsqu'il l'inocule, elle ne représente qu'une plante-hôte terminale (*dead-end host*) du phytoplasme. Aussi les infections du « bois noir » liées à ce vecteur ne sont pas épidémiques comme l'est la « flavescence dorée » transmise par la cicadelle ampélophage *S. titanus*. En revanche, la lavande et le lavandin représentent des hôtes de prédilection pour *H. obsoletus*, ce qui explique souvent la gravité des attaques sur ces hôtes.

Présence de phytoplasmes dans les vecteurs

Les phytoplasmes sont transportés de l'insecte à la plante par le canal salivaire et de la plante à l'insecte par le canal alimentaire (figure 4). Il sont toujours « intracellulaires » car localisés à l'intérieur des parois de la cellule-hôte mais alternativement « extracytoplasmiques », dans la sève des tubes criblés adultes dont le cytoplasme a disparu, et « intracytoplasmiques », dans les cellules des jeunes tubes criblés non différenciés (figure 4). De même, chez l'insecte, ils sont « extracytoplasmiques » dans l'hémolymphe, la lumière de l'intestin moyen et la salive et « intracytoplasmiques » dans les cellules du tube digestif, des glandes salivaires et d'autres cellules de l'insecte.

Un schéma général du cycle des phytoplasmes dans l'insecte et dans la plante a été proposé à la suite d'observations réalisées en microscopie électronique au cours de la transmission des phytoplasmes d'*Euscelis lineolatus* à la plante-hôte [23] (figure 5). Des mécanismes successifs d'endo- et d'exocytose les transporteraient de la lumière aux cellules du tube digestif puis dans l'hémolymphe, les glandes salivaires et la salive, d'où ils seraient transmis à la plante par le canal salivaire de l'insecte.

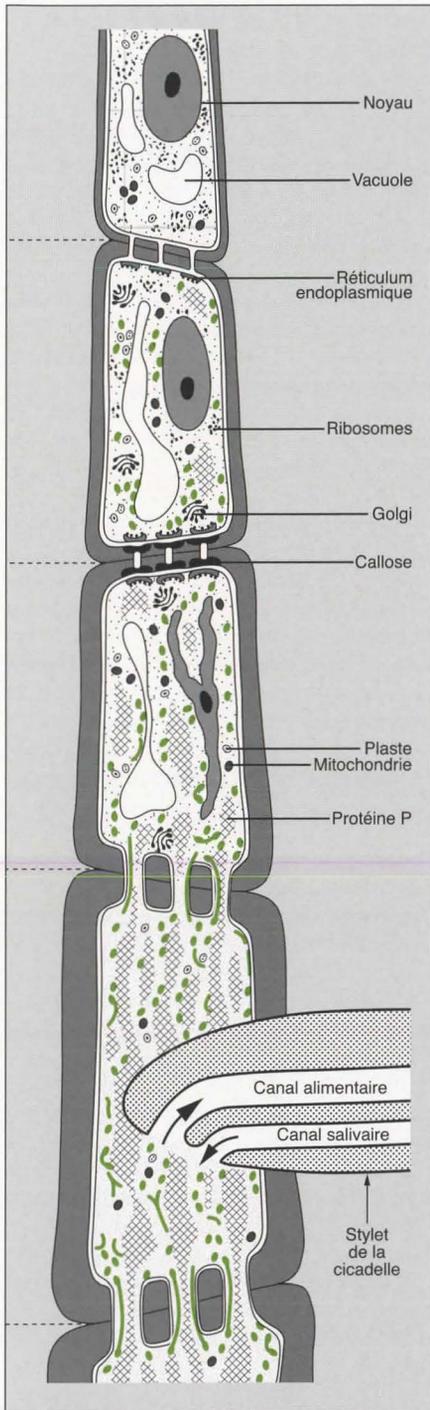


Figure 4. Stylet de l'insecte et tubes criblés en cours de différenciation (documents M.-T. Cousin). (Phytoplasmes figurés en vert)

Figure 4. Stylet of the insect and sieve tubes during their differentiation (documents M.-T. Cousin).

Stylet pénétrant dans la lumière d'un tube criblé adulte. Phytoplasmes transmis par le canal salivaire de l'insecte à la plante et par le canal alimentaire de la plante à l'insecte.

Partie supérieure : jeunes tubes criblés avec cribles non perforés et callose, noyaux et organites cytoplasmiques (vacuoles, reticulum endoplasmique, ribosomes, Golgi, plastes et mitochondries).

Partie inférieure : tubes criblés adultes, sève, parois perforées sans callose, absence d'organites cytoplasmiques.

« Phytoplasmes extracytoplasmiques » dans la sève des tubes criblés adultes et « intracytoplasmiques » dans le cytoplasme des jeunes tubes criblés. Tous sont « intracellulaires » car localisés à l'intérieur des parois des tubes criblés.

tin moyen IM, intestin postérieur IP, tubes de Malpighi TM, glandes salivaires GS et canal salivaire) et dans d'autres organes (corps gras CG, cerveau C et mycétome MY), en utilisant conjointement les tests ELISA sur organes isolés ainsi que l'immunomarquage avec amplification à l'argent en microscopie photonique et à l'or colloïdal en microscopie électronique. Dès la première semaine, les phytoplasmes aspirés au niveau du canal alimentaire atteignent la chambre filtrante et l'intestin moyen où ils se multiplient. Entre la deuxième et la cinquième semaine, ils pénètrent dans le mycétome, atteignent les glandes salivaires et leur canal. Enfin, lors de la huitième semaine, la multiplication s'est fortement intensifiée au niveau des glandes salivaires. Les phytoplasmes ont colonisé d'autres organes comme les corps gras et le cerveau. Cependant, ni les organes génitaux, ni les tubes de Malpighi ne sont atteints. Il existe une spécificité au niveau des glandes salivaires dont seuls certains acini contiennent des phytoplasmes.

Les expériences de transmission expérimentale sont longues et nécessitent un matériel important. La détection de phytoplasmes dans le corps des insectes, par dissection des glandes salivaires et réalisation de tests (ELISA ou PCR) sur ces organes isolés, constitue une étape préliminaire mais non suffisante pour conclure à leur pouvoir vecteur, car des barrières au niveau des organes de l'insecte peuvent empêcher la transmission jusqu'à la salive.

Le plus fréquemment, les phytoplasmes ne semblent pas préjudiciables à leurs insectes-vecteurs. Cependant certains effets néfastes ou bénéfiques de ces micro-organismes ont été décrits [26], notamment la réduction de la longévité des insectes infectés [4].

Mesures de quarantaine concernant les échanges de matériel végétal entre différents pays

Les échanges de matériel végétal entre différents pays doivent être rigoureusement contrôlés car ce matériel peut être porteur d'insectes-vecteurs ou de phytoplasmes.

Scaphoideus titanus, vecteur lié à la « flavescence dorée » de la vigne et originaire de vignes sauvages américaines, a probablement été introduit en Europe au début du siècle à l'état d'œufs insérés dans les écorces de vignes. Les paramètres climatiques favorables à son développement ont contribué à en faire un dangereux parasite car il prolifère dans tous les vignobles français du Sud de la Loire (Poitou-Charente, Aquitaine, Midi-Pyrénées, Languedoc-Roussillon, Corse, vallée du Rhône, Bourgogne, Franche-Comté et Savoie), d'Espagne (Catalogne) et du Nord de l'Italie (Vénétie-Frioul, Piémont et Ligurie). En Europe, la maladie n'existe que dans les zones où *S. titanus* est présent. Outre-Atlantique, dans l'État de New York (États-Unis), bien que *S. titanus* soit présent, la « flavescence dorée » n'a pas été identifiée.

Le transport de plantes atteintes de phytoplasmoses dans un pays où ces maladies n'existent pas, mais où des vecteurs potentiels sont présents, est particulièrement dangereux. Ainsi, aux États-Unis, l'importation de vignes infectées par la « flavescence dorée » pourrait être à l'origine de l'apparition de la maladie, propagée par le vecteur présent *S. titanus*. Un autre *Scaphoideus*, *S. luteus*, y est aussi présent et transmet la « jaunisse américaine de l'orme » dont l'agent responsable appartient au même groupe que le phytoplasme de la « flavescence dorée ».

Les phytoplasmes du groupe du « stolbur » existant en Europe et en Australie sont très voisins et leurs vecteurs, des cixiides, ont été trouvés en Europe, Israël et en Australie. Des échanges de matériel végétal entre ces pays doivent

Ces résultats furent précisés dans *Euscelidius variegatus*, vecteur expérimental de la « flavescence dorée » [24, 25]. Le cheminement des phytoplasmes, figurés en vert (figure 6), fut suivi pendant huit semaines entre leur acquisition par l'insecte et leur inoculation à la plante, dans l'appareil digestif du vecteur (canal alimentaire, chambre filtrante CF, intes-

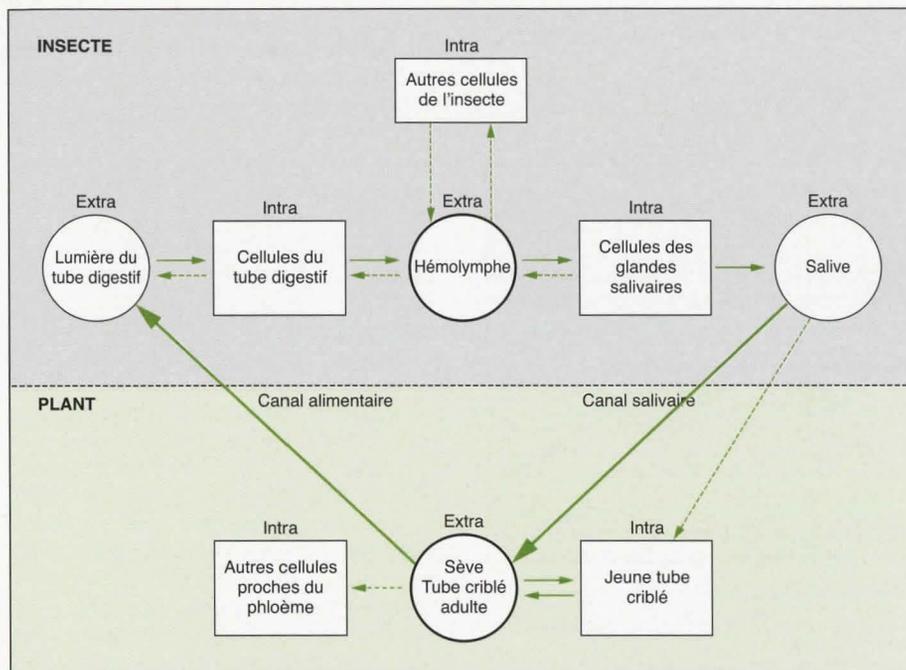


Figure 5. Passage des phytoplasmes de la plante à l'insecte et inversement (Maillet et Gouranton [23]).

Figure 5. Transport of phytoplasmas from plant to insect and reverse (Maillet and Gouranton [23]).

- Les flèches en trait plein indiquent les passages obligatoires. Les flèches en pointillé indiquent les passages possibles.
- « Intra » : phytoplasmes intracytoplasmiques.
- « Extra » : phytoplasmes extracytoplasmiques localisés dans des sites dépourvus de cytoplasme (lumière du tube digestif, hémolymphe et salive chez l'insecte, tube criblé adulte chez la plante), mais intracellulaires car localisés à l'intérieur des parois de la cellule-hôte.

donc être soumis à une quarantaine rigoureuse. Des vecteurs connus peuvent être transportés avec le matériel végétal et introduits dans une nouvelle région. Mais des vecteurs alternatifs peuvent également être présents dans la région où le matériel contaminé sera introduit, et prendre le relais de la propagation à la place du vecteur principal.

Méthodes de lutte conventionnelles

Sélection sanitaire, surveillance du matériel de départ : pieds-mères

Les phytoplasmoses ne sont pas transmissibles par les semences, mais les par-

ties végétatives contaminées peuvent être responsables de leur propagation, particulièrement dans le cas d'espèces ligneuses. La sélection sanitaire repose sur le choix de pieds-mères sains lorsque la multiplication s'effectue à partir d'organes végétatifs.

Dans le cas de plantes greffées, la sélection sanitaire exige le choix de pieds-mères sains à la fois pour la production de scions et de porte-greffes, ce qui est particulièrement délicat car des pieds sans symptômes peuvent se révéler infectés s'ils ont été contaminés tardivement au cours de l'été précédant le prélèvement des greffons, alors que la maladie est encore en incubation. De plus, certains porte-greffes sont tolérants et fréquemment infectés. Ils se comportent comme des porteurs « sains » et sont responsables de la propagation de maladies à phytoplasmes chez la vigne, de sorte qu'une sélection sanitaire rigoureuse est indispensable. L'indexage par greffage

d'une variété sensible telle que l'indicateur *Vitis vinifera* a révélé que les pieds-mères porteurs sains peuvent transmettre la phytoplasme, via leurs boutures, au futur jeune plant greffé. Des taux de transmission allant de 6 à 80 % des boutures greffables ont été observés [27].

Élagage de plantes malades

Dans certains cas, l'élagage de branches malades dès l'apparition des premiers symptômes peut être recommandé. Ainsi, des vignes dont les sarments présentant des symptômes de « Vergilbungskrankheit » (VK) ont été supprimés, peuvent se maintenir sans symptômes pendant plusieurs années. Cette méthode ne présente pas de risque dans le cas du « bois noir » puisque la vigne n'est pas un hôte préférentiel du vecteur.

L'élagage de branches présentant des symptômes de « flavescence dorée » peut être recommandé sur des vignes où *Scaphoideus titanus* a été éliminé par traitement. Sinon, l'élagage peut s'avérer dangereux en contribuant à maintenir des porteurs sans symptômes apparents, car la vigne est le principal hôte du vecteur, contrairement au cas du « bois noir » et de *Hyalesthes obsoletus* [27]. Dans le cas du « balai de sorcière du peuplier », l'élagage des rameaux situés à la base de l'arbre a été conseillé, car les jeunes larves de l'insecte-vecteur *Rhytidodus decimusquartus* migrent à partir de cette zone vers les parties supérieures de l'arbre au printemps [28].

Élimination des plantes-hôtes réservoirs

L'élimination des plantes-hôtes réservoirs est recommandée et, dans le cas de la « flavescence dorée » de la vigne, la destruction des vignes malades ou abandonnées, seuls hôtes et réservoirs de la maladie, est exigée.

En ce qui concerne le « bois noir » de la vigne et le « dépérissement jaune de la lavande et du lavandin » (groupe « stolbur »), l'élimination des adventices par le nettoyage des jachères et des chemins est fortement conseillée, le liseron (*Convolvulus arvensis*) et les labiées étant les principaux réservoirs de la maladie.

Dans le cas de la « phyllodie de la féve-rolle » au Soudan, le rôle de maintien de l'agent pathogène par les adventices (en particulier l'arbuste *Crotalaria saltiana*), entre deux années de culture de la féve-rolle, a été mis en évidence.

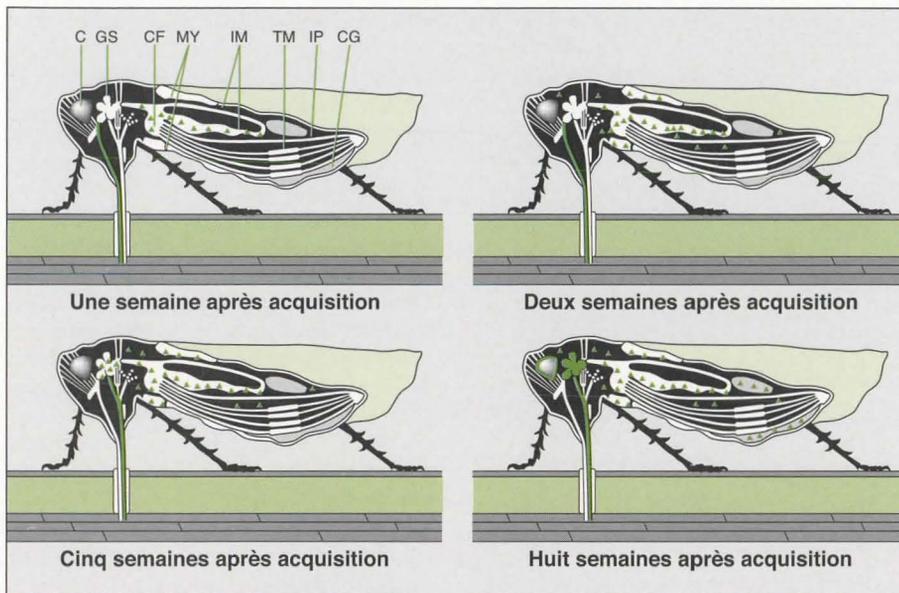


Figure 6. Trajet des phytoplasmes à l'intérieur d'un insecte-vecteur au cours des semaines suivant le repas d'acquisition (documents J. Lherminier et C. Lefol).
C : cerveau ; GS : glandes salivaires ; CF : chambre filtrante ; MY : mycétome ; IM : intestin moyen ; TM : tubes de Malpighi ; IP : intestin postérieur ; CG : corps gras.
(Phytoplasmes figurés en vert.)

Figure 6. Transport of phytoplasmas inside a vector during the weeks following an acquisition meal (documents J. Lherminier et C. Lefol).

Surveillance de l'activité des vecteurs

Dans le cas de la « flavescence dorée », *Scaphoideus titanus* est inféodé à la vigne et ne possède qu'une génération par an, ce qui facilite la lutte. Des avertissements de traitement ont été mis en place en France. Le premier, un mois après le début de l'éclosion, est destiné à éliminer tous les insectes, car ils sont susceptibles d'être infectieux un mois après leur premier repas pris sur une vigne malade. Un ou deux traitements additionnels sont appliqués à un mois d'intervalle. Ces traitements constituent actuellement la seule méthode de lutte efficace contre la maladie. On ne connaît pas, à l'heure actuelle en Europe, de parasites naturels de *S. titanus*, ce qui exclut toute possibilité de lutte biologique. Un programme de recherche a commencé pour détecter ces éventuels parasites en Amérique du Nord, pays d'origine de *S. titanus* [27]. La lutte est beaucoup plus aléatoire dans le cas du « bois noir » de la vigne transmis par *Hyalesthes obsoletus*, un cixiide polyphage qui ne se nourrit que très occasionnellement sur la vigne. Dans ce cas, on recommandera des pratiques culturales défavorables au vecteur. Le labour

du sol dans les vignobles contribue à détruire, par exposition au froid, les larves présentes sur les racines et il est recommandé pour réduire les populations de ce vecteur. Dans le cas du « dépérissement jaune du lavandin », dont le principal vecteur est aussi *H. obsoletus*, il conviendra encore de limiter l'extension des insectes et des plantes réservoirs. Ainsi, l'arrachage de vieilles plantations de lavandins sur les racines desquels *H. obsoletus* se multiplie activement est recommandé. Toutes les techniques culturales visant à l'élimination des adventices des champs de lavandins et des zones entourant ces champs sont favorables au maintien d'un bon état sanitaire des plantes.

Le cas de la « phyllodie du trèfle » représente une situation intermédiaire entre la « flavescence dorée » de la vigne et le « stolbur ». Parmi les principaux vecteurs, *Euscelis plebejus* et *Aphrodes bicinctus* intervenant dans cette transmission, *E. plebejus* possède plusieurs générations par an, ce qui rend la lutte plus difficile que dans le cas de la « flavescence dorée ». Cependant, ces insectes effectuent la majorité de leur cycle sur les trèfles de la pépinière et l'on connaît le rôle des larves hivernantes d'*E. plebejus*, capables de

transmettre la maladie dès leur reprise d'activité au printemps. Aussi la maladie a-t-elle pu être éradiquée en effectuant seulement deux traitements, l'un au printemps lors de la reprise d'activité des larves hivernantes, l'autre en automne afin de supprimer le maximum d'insectes susceptibles d'hiverner [4].

Thermothérapie

Une méthode pour guérir les vignes en immergeant les sarments dormants ou les plantes greffées, pendant 45 min dans de l'eau chaude à 50 °C s'est avérée efficace, sans danger et a été recommandée par l'*International Board for Plant Genetic Resource* (FAO/IBPGR) pour des déplacements de germesplasmés de vigne en toute sécurité [27]. Un programme d'élimination des phytoplasmes et des virus a été entrepris en Nouvelle-Zélande pour régénérer des variétés et des porte-greffes de poiriers introduits d'autres continents [29]. La thermothérapie s'est révélée efficace en Inde pour lutter contre les « pousses étroites » (*grassy shoot*) de la canne à sucre, phytoplasme qui constitue l'une des maladies les plus dangereuses pour cette espèce, avec des pertes de rendement pouvant atteindre 100 % [30]. La vapeur en milieu aéré, *aerated steam therapy* (AST), à 50 °C pendant une heure, ne suffit pas pour réduire la maladie de façon significative, tandis que le traitement à 52 °C, pendant la même durée, élimine complètement les phytoplasmes, sans altération des bourgeons.

Prémunition

La protection croisée, dont l'efficacité a été signalée dans le cas de la « prolifération du pommier » [31] et de l'enroulement chlorotique de l'abricotier » [32], pourrait être étendue à d'autres phytoplasmes responsables de maladies des arbres fruitiers contre lesquelles il n'existe pas actuellement de méthode efficace de lutte. Cependant, la prudence est de rigueur afin d'éviter la dissémination de porteurs « sains » (plantes d'apparence saine mais infectées par les phytoplasmes).

Recherche de variétés résistantes ou tolérantes par sélection classique

Les méthodes d'investigation permettent de distinguer entre résistance « vraie » à

l'agent pathogène, différences de sensibilité des cultivars, résistance à l'insecte vecteur ou variation de l'appétence d'une plante pour les vecteurs.

La « résistance vraie » qui semble peu fréquente dans la nature a été mentionnée dans la lutte contre la « jaunisse létale du cocotier » en Floride [33].

La « tolérance » est utilisée dans la lutte contre les phytoplasmoses des essences fruitières, forestières, ornementales et aromatiques. Les variétés européennes de pruniers, contrairement aux variétés japonaises, sont très tolérantes au phytoplasme responsable de la « leptonécrose, *plum leptonecrosis* » (PLN), considéré comme très voisin de celui de « l'enroulement chlorotique de l'abricotier, *apricot chlorotic leaf roll* » (ACLR) [34]. Les auteurs signalent une grande diversité dans l'intensité de la maladie chez les différents *Prunus* (*P. salicina*, *P. armeniaca*, *P. cerasifera* et *P. domestica*), tous fortement infectés. Un programme de sélection du frêne vert (*Fraxinus pennsylvatica* Marsh) pour la tolérance à la jaunisse « ash yellows » (AshY) a été proposé en utilisant comme critère de sélection l'héritabilité de l'index de volume du frêne [35]. Aux États-Unis et en Chine, une étude à grande échelle, faisant appel à des méthodes de diagnostic de plus en plus sensibles, a été menée sur *Prunus Virginiana* L. atteints de la « maladie X, Western X ». L'absence de symptômes, corrélée à une faible teneur en phytoplasmes, pourrait être utilisée dans des programmes de sélection en l'absence de résistance vraie [36]. Dans le cas du lavandin, des clones de moindre sensibilité « Super » et « Grosso » ont remplacé le clone « Abrial », autrefois très recherché pour la qualité de ses essences, mais particulièrement sensible [37]. La lutte contre le « Pear decline » (PD) et la « prolifération du pommier » utilise des porte-greffes de moindre sensibilité [38]. Cependant, dans le cas de la vigne, quelques porte-greffes tolérants, se comportant comme des porteurs « sains », contribuent à transmettre la maladie et à entraver le rétablissement des scions [39]. Les différences d'« attirance » de l'insecte-vecteur envers la plante peuvent aussi être à l'origine des variations de sensibilité observées. Ainsi, la maladie du « bois noir » de la vigne est fréquemment observée sur le cépage « Chardonnay » qui serait particulièrement attractif pour *Hyalosthes obsoletus*. Au contraire, des cépages moins attractifs pour l'insecte pourraient être recherchés [27].

Dans tous les cas, il convient d'augmenter la diversité génétique en intensifiant la recherche de nouveaux clones pour éviter les problèmes liés à la monoculture qui a grandement contribué au caractère épidémique du « dépérissement de *Populus nigra* cv Italica » en France dans les zones urbaines et suburbaines [28, 40]. L'homme semble aussi avoir été à l'origine de l'explosion épidémique du « dépérissement jaune du lavandin » en réduisant la diversité génétique du matériel végétal, en favorisant l'extension des champs de culture à des zones peu favorables et en augmentant la dimension des champs. Les efforts de sélection doivent désormais prendre en considération la résistance ou la tolérance au phytoplasme, la répulsion à ses vecteurs, la qualité des essences produites et une bonne adaptation au milieu [37]. En ce qui concerne le lavandin, hybride stérile, des amphidiploïdes possédant 100 chromosomes et produisant des graines ont été trouvés dans la nature ou obtenus par culture *in vitro*. Ainsi, une sélection pourrait être effectuée parmi leurs descendances.

Sujets de recherche à développer

Génétique et physiopathologie

Identification de gènes codant pour la résistance naturelle chez la plante

Les efforts pour identifier et introduire des gènes codant pour la résistance naturelle aux phytoplasmes chez la plante devront être poursuivis. Des programmes de sélection ont déjà été entrepris pour les arbres fruitiers, forestiers ou d'ornement. L'étude des porte-greffes présente un intérêt particulier dans le cas des arbres fruitiers. Il serait aussi intéressant de rechercher des sources de résistance chez des plantes sauvages proches des plantes cultivées.

Mécanismes intervenant dans la prémunition

La protection croisée s'est révélée efficace dans le cas de la « prolifération du pommier » [31] et de « l'enroulement chlorotique de l'abricotier » [32]. La nature de l'agent responsable de la prémunition,

qui est transmissible par la greffe et persiste chez l'arbre fruitier, n'a pas encore été élucidée. Plusieurs hypothèses sont envisagées : présence d'une souche avirulente ou faiblement virulente du phytoplasme responsable de la maladie ou association avec un phytoplasme « atypique » (dont le rôle devrait être élucidé) qui atténuerait la virulence du phytoplasme responsable de ces jaunisses. Ces mécanismes mériteraient d'être étudiés afin de développer des systèmes de protection croisée dans la lutte contre les phytoplasmoses chez d'autres arbres fruitiers.

Rôle des métabolites secondaires dans l'interaction entre plantes et phytoplasmes

Les variations, chez la plante-hôte, sous l'effet des phytoplasmes, de métabolites secondaires (polyphénols et polyamines comme la spermine, la spermidine et la putrescine), ont été étudiées [41]. L'apport de polyamines en culture *in vitro* de *Catharanthus roseus* entraîne une déformation et une agglutination des phytoplasmes, et simultanément un développement moins rapide des symptômes de la maladie. Ces résultats suggèrent donc un rôle important de ces métabolites dans les interactions entre plantes et phytoplasmes, en particulier dans les réactions de défense et dans les mécanismes de guérison de la plante. Cette voie de recherche, encore peu explorée dans le domaine des phytoplasmes, mériterait sans doute une étude plus approfondie.

Interactions entre phytoplasmes et hôtes (plante ou vecteur)

L'exploration des interactions des phytoplasmes avec leurs hôtes devra être considérée comme l'un des pôles de la recherche à venir.

Gènes intervenant dans la pathogénicité ou la transmissibilité

L'expression différentielle de gènes est utilisée pour l'étude de la biologie des mollicutes phytopathogènes dans différents environnements, plantes ou insectes-vecteurs. Les gènes de mollicutes transcrits seulement dans les plantes pourraient être liés aux phénomènes de pathogénicité, alors que ceux transcrits seulement sur insectes pourraient être reliés à la transmissibilité. L'identifica-

tion de gènes exprimés dans des souches de mollicutes pathogènes ou transmissibles, mais non dans des mutants non pathogènes ou non transmissibles, pourrait conduire à déceler des produits ou des fonctions liés à ces deux principales activités : pathogénicité des mollicutes ou transmissibilité par les insectes-vecteurs [42].

Une mutation naturelle de gènes contenus dans les plasmides de phytoplasmes responsables de la « virescence de l'oignon » (groupe des « *aster yellows* ») a été étudiée au Japon. Les oignons infectés par ce mutant présentaient des symptômes très faibles. Les différences de pathogénicité observées seraient reliées à des variations existant au niveau d'un plasmide [43]. La comparaison des séquences de ces plasmides sauvages ou mutés fait apparaître des différences concernant à la fois la structure du gène plasmidique et le nombre de copies, qui est inférieur chez le muté par rapport au sauvage. Ces résultats devraient être exploités dans la production de variétés moins sensibles ou résistantes à l'infection.

Protéine membranaire majeure des mollicutes et gènes qui la régulent

La protéine majeure de la surface des mollicutes joue un rôle important dans les phénomènes de reconnaissance, d'invasion et de pathogénicité envers les cellules de l'hôte. Ces phénomènes d'adhérence ont été étudiés dans le cas de la reconnaissance entre les mycoplasmes *stricto sensu* et leurs hôtes animaux [44].

La présence d'épitopes majeurs à la surface des cellules de phytoplasmes, spécifiques de chaque espèce de phytoplasmes, suggère que les protéines membranaires en cause jouent un rôle clé dans les interactions spécifiques du phytoplasme avec son hôte. L'adhésion aux cellules de l'hôte intervient dans le transfert à travers les barrières de l'insecte. Dans la plupart des cas, les phytoplasmes et leurs insectes-vecteurs semblent partager une symbiose qui reflète une longue période d'évolution commune. Le phytoplasme responsable de la « flavescence dorée » de la vigne s'attacherait à son vecteur au niveau de sites récepteurs spécifiques situés sur les cellules de l'intestin moyen et des glandes salivaires de l'insecte [45].

Aussi la caractérisation de ces protéines et des gènes correspondants est-elle importante. Le clonage et le séquençage des

gènes concernés ont été entrepris pour les phytoplasmes de la « flavescence dorée » [46], d'un isolat de l'« *aster yellows* » (AY), de la « phylodie du trèfle » [47], de la « prolifération du pommier, *apple proliferation* » (AP) [48] et du « balai de sorcière de la patate douce, *sweet potato witches' broom* » (SPWB) [49].

Connaissance du génome entier des phytoplasmes

La connaissance du génome entier permettra de progresser dans la compréhension des fonctions des différents gènes de phytoplasmes. L'utilisation de l'électrophorèse en champ pulsé permet de séparer la totalité de l'ADN chromosomique d'un phytoplasme de celui de la plante-hôte [50]. L'ADN ainsi obtenu n'étant pas en quantité suffisante, il convient de le digérer complètement avec un enzyme de restriction et de le cloner dans des vecteurs appropriés (chromosome artificiel de bactéries ou cosmides, *bacterial artificial chromosome*, BAC).

Le séquençage, après clonage, du génome de 670 kb du phytoplasme responsable de la « maladie X, *Western X disease* » (WX), est facilité par la carte physique de ce génome, déjà établie grâce à la concentration élevée du phytoplasme dans le céleri [51].

Introduction de gènes de résistance par manipulation génétique

Introduction de résistances à l'agent pathogène par manipulation génétique

Le but poursuivi est ici d'introduire dans le génome de la plante, des gènes codant pour des molécules capables d'interférer avec la multiplication du phytoplasme. Les anticorps dirigés contre les épitopes de la protéine membranaire des phytoplasmes inhibent leur développement et les gènes codant pour la production d'anticorps dirigés contre cette protéine sont à l'étude. Des manipulations génétiques de ces anticorps afin de les faire s'exprimer dans la plante ont connu des succès divers (échec dans le cas du maïs infecté par *Spiroplasma kunkelii* [52], succès dans le cas du « stolbur » sur tabac [53]). Il est important en la matière d'utiliser des promoteurs qui déterminent l'expression de la protéine au niveau du phloème, site de la multiplication des phytoplasmes.

Il convient toutefois de maintenir la diversité génétique tant au niveau des variétés qu'à celui des porte-greffes dans le cas des arbres fruitiers et de la vigne : la monoculture issue de manipulations génétiques pourrait s'avérer dangereuse.

Introduction de résistances au vecteur par manipulation génétique

La lutte contre les insectes-vecteurs de phytoplasmes par manipulation génétique peut être envisagée sous différents aspects.

La recherche de gènes intervenant dans les interactions entre insectes-vecteurs et mollicutes a été entreprise en vue de les utiliser comme cibles pour des manipulations génétiques destinées à déclencher la résistance. Dans le cas de *Spiroplasma citri* des mutations naturelles entraînent la perte de motilité et de transmission par insecte-vecteur. Les gènes liés à ces différents phénotypes ont été isolés et sont en cours de caractérisation [54].

L'introduction, dans la plante, de gènes de résistance vis-à-vis d'insectes-vecteurs ont donné des résultats positifs pour des insectes non suceurs de sève. Pour lutter contre des insectes suceurs de sève, un gène lié à un promoteur spécifique du phloème a été introduit chez le riz [55]. Actuellement, 50 espèces incluant des essences ligneuses comme le peuplier, ont été transformées génétiquement. Il devient envisageable d'obtenir, chez ces espèces, des clones résistants à des insectes suceurs de sève tels que les cicadelles.

Mais il conviendra encore d'éviter les risques liés à la monoculture des clones transformés.

Conclusion

La lutte contre les phytoplasmoses est particulièrement complexe et requiert l'intégration de nombreuses données : contrôle de l'état sanitaire du matériel de départ, création de pépinières de pieds-mères, recherche de conditions écologiques favorables, adaptation des pratiques culturales en vue de l'élimination des insectes-vecteurs et des plantes réservoirs, diversification des clones de moindre sensibilité. La connaissance des insectes-vecteurs est particulièrement importante, puisqu'ils ont un rôle clé dans la propagation des phytoplasmoses des cultures annuelles et des plantes ligneuses. On peut en outre les mettre en

cause dans l'apparition de nouvelles maladies, qu'ils soient introduits dans de nouvelles régions convenant à leurs exigences éthologiques, ou qu'ils contribuent à l'introduction accidentelle de phytoplasmes chez un nouvel hôte végétal de leur environnement. Il est donc important de mettre en œuvre des mesures limitant ces risques en approfondissant nos connaissances concernant la biologie et l'éthologie des espèces vectrices ainsi que les mécanismes moléculaires qui régulent la vection et les interactions entre plantes et insectes-vecteurs ■

Références

- Campbell BC, Steffen-Campbell JD, Sorensen JT, Gill RJ. Paraphyly of *Homoptera* and *Auchenorrhyncha* inferred from 18S rDNA nucleotide sequences. *Syst Entomol* 1995 ; 20 : 241-62.
- Maramorosch K. Direct evidence for multiplication of *aster yellows* virus in its insect vector. *Phytopathology* 1952 ; 42 : 59-64.
- Schvester D, Moutous G, Bonfils J, Carle P. Étude biologique des cicadelles de la vigne dans le Sud-Ouest de la France. *Ann Epiphyties* 1962 ; 13 : 205-37.
- Cousin MT, Moreau JP, Van Loon LC. Les maladies du trèfle transmises par cicadelles en France. *Ann Epiphyties* 1965 ; 16 : 137-49.
- Moreau JP, Cousin MT, Lacote JP. Rôle du jasside *Aphrodes bicinctus* (SCHRK) (Homoptères Auchenorrhynques) dans la transmission de jaunisses du trèfle blanc. *Ann Epiphyties* 1968 ; 18 : 103-10.
- Moreau JP, Boulay C. Mode de piqûre de trois cicadelles vectrices de virus, *Euscelis plebejus* Fall., *Macrostelus sexnotatus* Fall. et *Aphrodes bicinctus* Schrk. Étude histologique. *Ann Epiphyties*, n° hors série 1967 ; 18 : 133-41.
- Alma A, Bosco D, Danielli A, Bertaccini A, Vibio M, Arzone A. Identification of phytoplasmas in eggs, nymphs and adults of *Scaphoides titanus* Ball reared on healthy plants. *Insect Molecular Biology* 1997 ; 6 : 115-21.
- Suchov KC, Vovk AM. O biologii cikadki *Hyalesthes obsoletus* Sign. perenosnika virusa stolbur (biology of the planthopper *Hyalesthes obsoletus* Sign., vector of the stolbur virus). *Trudy instituta genetiki* 1948 ; 15 : 193-202.
- Leclant F, Lacote JP. Recherches sur les vecteurs du stolbur dans le Midi de la France. (*Homoptera* : *Cixiidae*). *Ann Phytopathol* n° hors série 1969 ; 19 : 439-42.
- Sforza R, Clair D, Daire X, Larrue J, Boudon-Padieu E. The role of *Hyalesthes obsoletus* (Hemiptera : *Cixiidae*) in the occurrence of "Bois noir" of grapevines in France. *J Phytopathol* 1998 ; 146 : 549-56.
- Maixner M. Transmission of German grapevine yellows (Vergilbungskrankheit) by the planthopper *Hyalesthes obsoletus* (Auchenorrhyncha : *Cixiidae*). *Vitis* 1994 ; 33 : 103-14.
- 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.
- Padovan A, Gibb K, Daire X, Boudon-Padieu E. A comparison of the phytoplasma associated with Australian grapevine yellows to other phytoplasmas in grapevine. *Vitis* 1996 ; 35 : 189-94.
- Jensen DD, Griggs WH, Gonzales CO, Schneider H. Pear decline virus transmission by pear psylla. *Phytopathology* 1964 ; 54 : 1346-51.
- Lemoine J. Dépérissement du poirier : rôle de *Psylla pyri* dans sa dissémination. *Arboriculture fruitière* 1991 ; 442 : 28-32.
- Davies DL, Guise CM, Clark MF, Adams AN. Parry's disease of pears is similar to pear decline and is associated with mycoplasma-like organisms transmitted by *Cacopsylla pyricola*. *Plant Pathol* 1992 ; 41 : 195-203.
- Battle A, Lavina A, Marta F, Medina V. Incidence and epidemiology of pear decline in North-Eastern Spain. First Internet Conference on Phytopathogenic Mollicutes 1999. <http://www.uniud.it/phytoplasma/pap/bat15100.html>.
- Alma A, Navone P, Visentin C, Arzone A, Bosco D. Rilevamento di fitoplasmi di « Apple proliferation » in *Cacopsylla melanoneura* (Förster) (Homoptera Psyllidae). Atti Incontro Nazionale sulle malattie da Fitoplasmi. Stato attuale delle conoscenze, Udine, 21-22 Settembre 1999 : 65-7.
- Frisinghelli C, Delaiti L, Grando MS, Forti D, Vindimian ME. *Cacopsylla costalis* (Flor 1861), as a vector of Apple proliferation in Trentino. *J Phytopathol* 2000 ; 148 : 425-31.
- Carraro L, Osler R, Loi N, Ermacora P, Refatti E. Transmission of the European stone fruit yellows phytoplasma *Cacopsylla pruni*. *J Plant Pathol* 1998 ; 80 : 233-9.
- Leclant F, Marchoux G, Giannotti J. Demonstration of the vector role of the psyllid *Trioxa nigricornis* Forst (Homopterous insect) in the transmission of a proliferation disease of *Daucus carota* L. *CR Acad Sci Paris* 1974 ; 278 : 57-9.
- Giannotti J, Louis C, Leclant F, Marchoux G, Vago C. Infection due to mycoplasmas and to micro-organisms with rickettsia pattern in a plant affected by proliferation and in the psyllid vector of the disease. *CR Acad Sci Paris* 1974 ; 278 : 469-71.
- Maillet PL, Gouranton J. Étude du cycle biologique du mycoplasme de la phylloïdie du trèfle dans l'insecte vecteur, *Euscelis lineolatus* Brullé (Homoptera, Jassidae). *Journal de Microscopie* 1971 ; 11 : 143-62.
- Lherminier J, Prensier G, Boudon-Padieu E, Caudwell A. Immunolabeling of grapevine flavescence dorée MLO in salivary glands of *Euscelidius variegatus*: a light and electron microscopy study. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 1990 ; 38 : 79-85.
- Lefol C, Lherminier J, Boudon-Padieu E, Larrue J, Louis C, Caudwell A. Propagation of flavescence dorée MLO (mycoplasma-like organism) in the leafhopper vector *Euscelidius variegatus* Kbm. *J Inverteb Pathol* 1994 ; 63 : 285-93.
- Maramorosch K, Jensen DD. Harmful and beneficial effects of plant viruses in insects. *Ann Rev Microbiol* 1963 ; 17 : 495-530.
- Boudon-Padieu E. *Grapevine phytoplasmas*. First Internet Conference on Phytopathogenic Mollicutes 1999 ; <http://www.uniud.it/phytoplasma/pap/boud8290.html>
- Cousin MT. Witches' broom: a phytoplasma disease of poplar. In: Raychaudhuri SP, Maramorosch K, eds. *Forest Trees and Palms. Diseases and Control*. Lebanon?, New Hampshire, États-Unis : Science publishers, 1996 : 267-83.
- Wood GA. Viruses and phytoplasma in European pear trees in New Zealand and the role of these pathogens in the compatibility of pear with quince rootstocks. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 1997 ; 25 : 333-40.
- Viswanathan R, Padmanaban P, Ramesh Sundar A, Prakasam N, Tripathi BK. *Different aerated steam therapy (AST) regimes on grassy shoot disease caused by phytoplasmas in sugarcane*. First Internet Conference on Phytopathogenic Mollicutes 1999 ; <http://www.uniud.it/phytoplasma/pap/muse0100.html>
- Kunze L. The effect of different strains of apple proliferation on the growth and crop of infected trees. *Mitt Biol Bundesamt Land-Forstwirtschaft Berlin-Dahlem* 1976 ; 170 : 107-15.
- Castelain C, Chastelière MG, Jullian JP, Morvan G, Lemaire JM. La prémunition contre l'enroulement chlorotique de l'abricotier. Bilan de dix années d'observation sur huit vergers. *Phytoma* 1997 ; 493 : 39-44.
- McCoy RE, Howard FW, Tsai JH, et al. Lethal yellowing of palms. *Univ Fl IFAS Agric Exp Stn Tech Bull* 1993 ; 834 : 1-100.
- Carraro L, Loi N, Ermacora P, Osler R. High tolerance of European plum varieties to plum leptonecrosis. *European Journal of Plant Pathol* 1998 ; 104 : 141-5.
- Sinclair WA, Whitlow TH, Griffiths HM. Heritable tolerance of ash yellows phytoplasmas in green ash. *Can J For Res* 1997 ; 27 : 1928-35.
- Guo YH, Cheng ZM, Walla JA, Zhang Z. Large-scale screening for X-disease phytoplasma infection in chokecherry. *Hort Science* 1998 ; 33 : 293-5.
- Cousin MT, Moreau JP. Yellow decline of Lavandin (Hybrid *L. Officinalis* x *L. Latifolia*): a MLO (mycoplasma-like organism) disease. Symptoms, experimental transmission, ultrastructural studies, role of leafhoppers, methods of control. In: Raychaudhuri SP, ed. *Recent Advances in Medicinal, Aromatic and Spice Crops*. New Delhi, India : Today and Tomorrow's Printers and Publishers, 1991 ; 1 : 59-62.
- Seemuller E, Lorenz KH, Lauer U. Fruit tree phytoplasmas. Pear decline resistance in *Pyrus communis* rootstocks and progenies of wild and ornamental *Pyrus* taxa. In: Hadidi A, ed. *Proc. 17th Int. Symp. on Fruit Tree Virus Dis. Acta Hort* 1998 ; 472 : 681-7.
- 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.
- 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.
- Musetti R, Pressaco L, Vighi C, Favali MA, Torrigiani P. *Secondary metabolites in phytoplasma-infected plants*. First Internet Conference on Phytoplasma Mollicutes 1999 ; <http://www.uniud.it/phytoplasma/pap/muse0100.html>
- Rascoe J, Melcher U, Fletcher J. Arbitrarily primed PCR of cDNA for determination of differential gene presence and expression among lines of *Spiroplasma citri*. *Phytopathology* 1998 ; 88 (suppl. 9) : S75.
- 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.

44. Razin S. Mycoplasma adherence. In : Razin S, Barile M, eds. *The Mycoplasmas. Vol. IV.* New York : Academic Press, Inc, 1985 : 160-202.
45. Lefol C, Lherminier J, Boudon-Padiou E, et al. Presence of attachment sites accounting for recognition between "Flavescence dorée" MLO and its leafhopper vector. *IOM Letters* 1994 ; 3 : 283.
46. Farmer MJ, Boudon-Padiou E. Cloning and expression of flavescence dorée mycoplasma-like organism membrane protein in Lambda Zap expression vector. *IOM Letters* 1994 ; 3 : 237.
47. Davies DL, Clark MF, Barbara D. *Cloning and sequencing of the genes determining a major membrane protein associated with the chlorotic isolate of aster yellows and clover phyllody.* First Internet Conference on Phytopathogenic Mollicutes 1999 ; <http://www.uniud.it/phytoplasma/pap/davi7140.html>
48. Berg M, Davies DL, Clark MF, Vetten J, Maier G, Seemuller E. Isolation of a gene encoding an immunodominant membrane protein gene of the apple proliferation phytoplasma and expression and characterization of the gene product. *Microbiology* (in press).
49. Yu YL, Yeh KW, Lin CP. An antigenic protein gene of a phytoplasma associated with sweet potato witches' broom. *Microbiology* 1998 ; 144 : 1257-62.
50. 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.
51. Firrao G, Smart CD, Kirkpatrick BC. Physical map of the Western X-disease phytoplasma chromosome. *J Bacteriol* 1996 ; 178 : 3985-8.
52. Chen YD, Chen TA. Expression of engineered antibodies in plants: a possible tool for phytoplasma and phytoplasma disease control. *Phytopathology* 1998 ; 88 : 1367-71.
53. Le Gall F, Bové JM, Garnier M. Engineering of a single-chain variable-fragment (scFv) antibody specific for the stolbur phytoplasma (Mollicute) and its expression in *Escherichia coli* and tobacco plants. *Applied and Environmental Microbiology* 1998 ; 64 : 4566-72.
54. Foissac X, Danet JL, Saillard C, et al. Mutagenesis insertion of tn 4001 into the genome of *Spiroplasma citri*: characterization of mutants affected in plant pathogenicity and transmission to the plant by the leafhopper vector *Circulifer haematocaps*. *Mol Plant Microb Interact* 1997 ; 10 : 454-61.
55. Tang K, Davey MR, Blackhall NW, et al. *Transformation of Japonica rice with an insect resistance gene driven by a phloem specific promoter.* International Congress of Plant Molecular Biology, Amsterdam, June 19-24, 1994.

Summary

Phytoplasma and phytoplasma diseases: vectors, control, and research topics

M.-T. Cousin, É. Boudon-Padiou

Phytoplasma vector species belong to hemipters (Figure 1) that are phloem-feeding insects. Three families (Jassidae (Figure 2), Cixiidae and Psyllidae) contain the known vector species. However, information is still lacking on vectors of numerous phytoplasma diseases.

A high specificity between vector and disease is frequently observed. It has been shown that phytoplasma circulate, multiply and persist in the body of leafhopper vectors. Though detection of phytoplasma in eggs, nymphs, and adults of Scaphoideus titanus specimen reared on healthy plants has been reported, it is considered as a rule that phytoplasma are not transmitted vertically to the progeny of infected specimen. Among planthoppers, species in the cixiid family are known to transmit phytoplasma belonging to the "stolbur" group and to a closely related group. Among psyllids, several species have been shown to transmit diseases of fruit trees, which are all associated with phytoplasma in the same group.

The transmission cycle of phytoplasma depends on the life cycle and ethology of their vectors. Scaphoideus titanus, the vector species of "flavescence dorée", is a monovoltine species restricted to Vitis sp., thus conferring to this grapevine yellows the very particular traits of an epidemic disease. In the case of Euscelis plebejus, a vector of "clover phyllody" (Figure 3a), the number of cycles per year and hibernation sites differ with climate, hibernation as larvae occurring in oceanic areas and hibernation as eggs in continental areas. In the case of Hyalesthes obsoletus (Figure 3b) and Pentastiridius beieri, most of the life cycle is carried out underground where eggs and larvae can be found on the plant roots. The aerial stage is limited to winged adults that migrate for about six weeks in summer. These cixiid vectors of "stolbur" phytoplasma are polyphagous species, that ensure to "stolbur" phytoplasma complex transmission cycles, with various hosts and a few preferential host plants that can act as phytoplasma reservoirs threatening susceptible crops.

The circulation of phytoplasma between insects and plants (Figure 4) and the mechanism of phytoplasma transmission (Figure 5) are described. Phytoplasma are always "intracellular", located inside the cell walls of their hosts, either as "extra-cytoplasmic" in mature sieve tubes of plants, in haemolymph, gut lumen and saliva of insects or as "intra-cytoplasmic" in young sieve tubes of plants and in insect cells. It has been shown that circulation and multiplication of "flavescence dorée" phytoplasma in the body of an experimental leafhopper vector (Figure 6) meet with two important specific events, i.e. trespassing of the gut membrane after ingestion and penetration of specific secretor cells of salivary glands. Molecular factors for the specific transmission of phytoplasma by insects are not known.

Transportation of phytoplasma-infected plants is dangerous or forbidden (quarantine diseases) even if the specific vector species is absent in the importation area, since potential alternative vector species may be present. Similarly, introduction of an exotic insect species in a new area is dangerous and should be avoided by all means. Scaphoideus titanus was introduced from North America to Europe as eggs inserted in the bark of vine planting material. Quarantine of "stolbur" phytoplasma transmitted by cixiids, should be recommended between Europe, Australia and the Near East where related phytoplasma isolates have been detected.

Conventional control methods include sanitary selection, in some cases pruning of branches of woody plants with localized symptoms, destruction of phytoplasma reservoir plants, monitoring of vector species, thermotherapy, cross protection and genetic selection for tolerant or resistant varieties. Phytoplasma are not transmitted through seeds but through vegetative parts. Sanitary selection should include scion and rootstock material. Mother-plants should be carefully screened because of latency of infection or tolerance which may result in healthy-looking, nevertheless infected branches that greatly contribute to propagation and long-distance diffusion of diseases.

Pruning of symptom-showing parts of woody plants may be efficient to limit the economical effects of the disease, for instance in the case of "bois noir" or "vergilbungskrankheit" where vine stock is a "dead-end host" for the associated "stolbur" phytoplasma transmitted by the occasional vine-feeder *Hyalesthes obsoletus*. Similar pruning would be dangerous in the case of "flavescence dorée", unless *Scaphoideus titanus* has been completely eliminated by insecticide treatments. If this is not so, pruning could mask the disease but it would not prevent diffusion of phytoplasma by the vector. In the case of the "witches'broom of *Populus nigra* cv *Italica*", pruning of lower branches reduces the movement of vector larvae towards the upper parts of poplar.

Destruction of reservoirs is recommended. In the case of "flavescence dorée", a quarantine disease, it includes uprooting of diseased vine stocks and of abandoned vine plots which are also a shelter to vector leafhoppers. Direct vector control is available if the vector is restricted to the crop and if the number of generations per year is limited. Compulsory insecticide application programs against *Scaphoideus titanus* have been developed according to the life cycle of the species and to the transmission cycle of the phytoplasma. Search for natural enemies to be used in biological control is currently being developed. Control schemes are more difficult to set up in the cases of vectors with several generations per year, such as *Euscelis plebejus*, vector of "clover phyllody" or with numerous host plants including weeds such as *Hyalesthes obsoletus*, vector of "bois noir", "vergilbungskrankheit" and "decline of *Lavandula* sp.". The weeds should be eliminated by cultivation practice.

Curing of dormant plant material by soaking into hot water (50° C, 45 min) is efficient on grapevine, use of aerated steam therapy (52° C, 1 hr) on sugar cane. Cross protection has been reported in the case of fruit trees. More should be known on the mechanism to avoid latently diseased plants.

Natural resistance and tolerance are being investigated, as well as possible cultivar feeding preferences of vector species. True resistance to phytoplasma disease is rare but it has been reported in the case of "coconut lethal yellowing". Tolerance has been used to control diseases of fruit trees (*Prunus*, *Malus*), forest trees (*Fraxinus*), ornamental (*Prunus virginiana*), and aromatic (*Lavandula*) plants. Feeding preference is suspected in the case of *Hyalesthes obsoletus* on Chardonnay, a grapevine cultivar which is very susceptible to "bois noir".

Monoculture and cultivation of clonal material on large areas may have favoured the development of epidemic diseases or increased the incidence of occasional diseases. Thus, controlling of phytoplasma diseases requires a diversification of the genetic material and an integrated approach of biological, ecological, climatic factors and cultivation practice.

Research should aim at a better knowledge of resistance, tolerance and recovery of cultivars. Molecular technology approaches include the study of phytoplasma genes involved in pathogenicity and transmissibility, of the role of major membrane proteins in recognition mechanisms with insect organs and the comprehensive study of the phytoplasma genome. Prospective research might deal with breeding of plants modified by genetic engineering and screened for resistance either to phytoplasma or to vector-insect.

Cahiers Agricultures 2002 ; 11 : 115-26.

Résumé

Les phytoplasmes sont transmis par des insectes appartenant à l'ordre des Hémiptères (cicadelles *stricto sensu*, cixiides et psylles). Leurs cycles dans la nature, le cheminement des phytoplasmes dans la plante et dans l'insecte sont décrits ainsi que les mesures de quarantaine requises. Les méthodes de lutte contre les phytoplasmoses comportent la sélection sanitaire, l'élimination des réservoirs, la surveillance de l'activité des insectes-vecteurs, la thermothérapie, la prémunition, la résistance ou la tolérance variétale. L'identification des bases génétiques de la résistance naturelle des plantes, de la pathogénicité et de la transmissibilité, la connaissance du génome des phytoplasmes, l'étude des mécanismes de la prémunition et l'introduction de gènes de résistance aux phytoplasmes ou aux insectes-vecteurs par manipulation génétique, constitueront des pôles de recherches futures.
