



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di riferimento: AGRONOMIA ALIMENTI RISORSE
NATURALI E AMBIENTE

Dipartimento del relatore: AGRONOMIA AMBIENTALE E PRODUZIONI
VEGETALI

Corso di laurea in scienze e tecnologie agrarie

TESI DI LAUREA

INDAGINI EPIDEMIOLOGICHE SU ‘*CANDIDATUS PHYTOPLASMA
ASTERIS*’ IN COLZA

Relatore: Prof. Nicola Mori

Laureando: Davide Bollettin

N. matricola: 580856-TG

Correlatore: Prof.ssa Assunta Bertaccini

Prof. Francesco Pavan

ANNO ACCADEMICO

2012-2013

INDICE

1. INTRODUZIONE

1.1 Il colza

1.1.1 Caratteristiche botaniche

1.1.2 Importanza e diffusione

1.1.3 Insetti e malattie

1.2 I fitoplasmi

1.2.1 Caratteristiche generali

1.2.2 Trasmissione

1.2.2.1 Trasmissione tramite insetto vettore

1.2.2.2 Trasmissione via seme

1.2.3 Classificazione

1.3 Scopo del presente lavoro

2. MATERIALI E METODI

2.1 Indagini epidemiologiche

2.1.1 Osservazioni sintomi in campo

2.1.2 Cattura ed identificazione insetti potenziali vettori

2.2 Indagini molecolari

2.2.1 Estrazione DNA da materiale vegetale

2.2.2 Estrazione DNA da insetti

2.2.3 Amplificazione genica (PCR)

2.2.4 Analisi del polimorfismo della lunghezza dei frammenti di restrizione (RFLP)

2.3 Prova di trasmissione del fitoplasma attraverso il seme di propagazione

3. RISULTATI

3.1 Indagini epidemiologiche

3.1.1 Osservazioni sintomi in campo

3.1.2 Cattura ed identificazione insetti potenziali vettori

3.2 Prova di trasmissione del fitoplasma attraverso il seme di propagazione

4. CONCLUSIONI

5. BIBLIOGRAFIA

CAP. 1: INTRODUZIONE

IL COLZA

1.1.1 Caratteristiche botaniche

Il colza (*Brassica napus* L. var. *oleifera*) è una *Brassicacea* oleaginosa (Foto 1). Presenta specie annuali (varietà primaverili) e biennali (varietà invernali). La radice è di tipo fittonante non molto profonda che all'apice dello sviluppo può raggiungere i 50-60 cm; il fusto si presenta eretto, ramificato con 20-22 internodi che può superare i 150 cm di altezza. Le foglie basali sono lobate quelle superiori sono sessili, abbraccianti parzialmente il fusto con la parte basale della lamina. Le infiorescenze sono terminali a grappolo con fioritura scalare. Il frutto che si forma è una siliqua (Fig. 1).



Foto e Figura 1: Tipo di infiorescenza e suoi componenti (a destra). (da www.Colza.it/immagini)

1.1.2 Importanza e diffusione

Il colza è coltivata su una superficie di circa 25.000 ha in Italia (ISTAT 2012), principalmente in semina autunnale nelle regioni del nord (Friuli Venezia Giulia, Veneto e Lombardia) con una resa media in queste zone di oltre 2 t ha⁻¹. Il seme viene principalmente utilizzato per la produzione di olio da cui si ricava il biodiesel, biocombustibile liquido applicato come sostituto del gasolio nei motori diesel. Anche la farina di estrazione trova una sua collocazione mercantile nella mangimistica.

Il panorama varietale italiano del colza invernale da olio comprende differenti tipologie genetiche, anche di recente introduzione come ibridi CHH ('Composite Hybrid Hybrid'), ibridi CHH semi-dwarf (semi-nani), CHL ('Composite Hybrid Line') e linee a libera impollinazione; tra le quali l'agricoltore può scegliere quelle che meglio si adattano alle proprie condizioni di coltivazione (Zanetti *et al.*, 2008).

1.1.3 Insetti e malattie

Tra le avversità biotiche del colza italiano risultano particolarmente dannosi gli attacchi dei funghi *Plasmodiophora brassicae*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Phoma lingam*. Per quanto riguarda i fitofagi sono stati segnalati attacchi dell'afide *Brevicoryne brassicae*, di lepidotteri, *Evergestis extimalis* e *Pieris brassicae* e di coleotteri afferenti alle famiglie dei nitidulidi (genere *Meligethes*) crisomelidi (genere *Phyllotreta*) e curculionidi (generi *Baris* e *Ceutorhynchus*), per quanto riguarda i fitoplasmi, sono trasmessi da diverse cicaline (Weintraub e Beanland, 2006).

1.2 FITOPLASMI

1.2.1 Caratteristiche generali

I fitoplasmi sono batteri fitopatogeni appartenenti alla classe dei *Mollicutes*, hanno dimensioni variabili tra i 200 e i 1.000 nm e mancano di parete, sono dotati di membrana che delimita il citoplasma contenente ribosomi e DNA, hanno un genoma di piccole dimensioni, variabile da 530 a 1.350 kb, con un basso contenuto in G + C. Sono parassiti obbligati, vivono nei tubi floematici delle piante e nell'emolinfa degli insetti vettori, i quali sono i maggiori responsabili della loro trasmissione e diffusione.

I fitoplasmi sono batteri in grado di invadere efficacemente i tessuti floematici delle piante e l'emolinfa degli insetti ed in natura vengono trasmessi da pianta a pianta attraverso l'atto trofico (punture) di insetti appartenenti principalmente all'ordine degli Hemiptera. Le specie vegetali in cui sono stati individuati i fitoplasmi sono circa 700, distribuite in zone che vanno dalle regioni temperato-calde a quelle tropicali e comprendono monocotiledoni e dicotiledoni, legnose ed erbacee.

I sintomi tipici di fitoplasmosi variano a seconda della specie vegetale ospite, generalmente si ha arresto o rallentamento della crescita con accorciamento degli internodi, perdita di dominanza apicale e conseguente aspetto cespuglioso derivante dallo sviluppo delle gemme laterali (scopazzi), produzione di rosette fogliari, stipole ingrossate e allungate, malformazione dei frutti con ridotto sviluppo e cascola precoce, ingiallimento fogliare (in alcuni casi le fitoplasmosi prendono anche il nome di giallumi) ma anche colorazioni rosso violacee a seconda dei pigmenti prodotti dalla pianta ospite, nanismo, fillodia (trasformazione degli organi fiorali in foglie), alterazione del bioritmo legato alle stagioni (fioritura anticipata), alterazione dell'equilibrio ormonale, virescenza (sviluppo di fiori verdi) e in alcuni casi anche la morte della pianta (Lee *et al.*, 2000).

In natura i fitoplasmi sono trasmessi da insetti emitteri (Cixidi, Cicadellidi, e Psillidi) solitamente floemizi, muniti di apparato boccale succhiatore perforante attraverso il quale acquisiscono e re-iniettano le cellule da e nelle cellule floematiche della pianta ospite.

1.2.2 Trasmissione

1.2.2.1 Trasmissione tramite insetto vettore

La trasmissione dei fitoplasmi può avvenire tramite insetti vettori, piante parassite, tecniche di propagazione vegetativa (micropropagazione) e attraverso seme. La trasmissione attraverso gli insetti vettori è di tipo persistente-propagativo; si distinguono tre fasi strettamente interdipendenti:

- fase di acquisizione: si realizza mediante le punture trofiche su piante infette; il tempo di nutrizione necessario varia da 2 a 4 giorni e la capacità di acquisizione da parte dell'insetto è più elevata nelle forme giovanili. Inoltre è possibile anche la trasmissione transovarica da femmine infette alla prole (Alma *et al.*, 1997; Tedeschi *et al.*, 2006).
- fase di latenza: avviene la moltiplicazione e la diffusione nelle cellule parietali del mesentero dell'insetto, quindi nell'emolinfa poi in organi come tubi malpighiani, ovario e passaggio nelle ghiandole salivari.

- fase di inoculazione: quando la concentrazione delle cellule del fitoplasma ha raggiunto certi valori nelle ghiandole salivari, l'insetto è in grado di trasmetterlo a nuove piante.

L'acquisizione di un fitoplasma da parte di un insetto vettore è condizionata da molti fattori biologici come la specie, il biotipo, l'età e il sesso, dalle caratteristiche della pianta sorgente di inoculo, ma anche da fattori ambientali come la temperatura, l'umidità e il fotoperiodo.

1.2.2.2 Trasmissione via seme

La possibilità della trasmissione dei fitoplasmi tramite seme era fino a pochi anni fa considerata altamente improbabile a causa della mancanza di una diretta connessione tra il sistema floematico e gli embrioni o semi in via di sviluppo (Menon e Pandalai, 1960). Inoltre la presenza di anomalie fiorali e malformazioni nei frutti aveva portato alla convinzione che i semi originati da piante infette non fossero vitali e germinabili (McCoy *et al.*, 1989).

Uno studio più approfondito (Olivier e Galka, 2008) ha evidenziato la presenza di due diverse tipologie di semi provenienti da piante di piante di *Brassica napus* infette da AY. Semi malformati, provenienti da piante sintomatiche ed asintomatiche sono risultati positivi alle analisi di PCR a fitoplasmi rispettivamente nel 25-80% e nel 9-20% dei casi, mentre semi di forma normale hanno raggiunto valori di positività alla presenza di questi procarioti di 20-60% e 2-10%. La prima tipologia, sia da piante sintomatiche che asintomatiche, ha registrato percentuali di germogliamento praticamente nulle, al contrario della seconda che ha raggiunto valori del 50-90% (Olivier e Galka, 2008).

I fitoplasmi sono in grado di infettare le strutture fiorali, i frutti, i semi anche a livello dell'embrione. I semi prodotti da piante malate sono generalmente vitali e germinabili, sebbene la produzione ne risulti qualitativamente e quantitativamente compromessa in relazione al rapporto fase di fioritura/momento d'infezione. Per una conferma della trasmissibilità dei fitoplasmi tramite seme è necessario l'ottenimento di progenie in cui l'infezione sia mantenuta nel tempo e manifesti sintomi anche se non necessariamente specifici (Calari *et al.*, 2011).

1.2.3 Classificazione

In Allegato 1 è riportata la classificazione dei ‘*Candidatus Phytoplasma*’ (Lee *et al.*, 1998) aggiornata al 2012 (Duduk e Bertaccini 2011, A. Bertaccini, dati non pubblicati). Nel corso degli ultimi anni, numerosi diversi fitoplasmi sono stati individuati e questi rapidi sviluppi hanno fatto pensare alla necessità di un aggiornamento dello schema di classificazione basata sui gruppi e sottogruppi ribosomici. Per questo motivo è stato realizzato un software di simulazione di analisi RFLP (*in silico*) capace di identificare eventuali nuovi fitoplasmi in funzione della loro omologia genica sulla sequenza del gene 16S rDNA (Wei *et al.*, 2007), ma questo sistema di classificazione non risulta pienamente accettato ed è ancora in discussione la sua affidabilità. Attualmente sono 10 le specie di ‘*Candidatus Phytoplasma*’ che sono state pubblicate senza riferimento ad un gruppo ribosomico (Tabella 1).

'Candidatus Phytoplasma'	Acc. no. GenBank	Malattia associata	Provenienza	Fonte bibliografica
'Ca. P. japonicum'	AB010425	Hydrangea phyllody	Giappone	Sawayanagi <i>et al.</i> , 1999
'Ca. P. castaneae'	AB054986	Chestnut witches' broom	Corea	Jung <i>et al.</i> , 2002
'Ca. P. pini'	AJ310849	Pinus decline	Germania	Schneider <i>et al.</i> , 2005
'Ca. P. rhamni'	AJ583009	Rhmnus witches' broom	Italia	Marcone <i>et al.</i> , 2004a
'Ca. P. allocalcasuarinae	AY135523 AY135524	Allocalcasuarina yellows	Australia	Marcone <i>et al.</i> , 2004a
'Ca. P. fragariae'	DQ086423	Strawberry yellows	Lituania	Valiunas <i>et al.</i> , 2006
'Ca. P. lycopersici'	EF199549	'Brote grande' tomato	Bolivia	Arocha <i>et al.</i> , 2007
'Ca. P. tamaricis'	FJ432664	Salt cedar witches' broom	Cina	Zhao <i>et al.</i> , 2009
'Ca. P. rubi'	AY197648	Rubus stunt	Italia	Malembic-Maher <i>et al.</i> , 2010
'Ca. P. costaricanum'	HQ225630	Soybean decline	Costarica	Lee <i>et al.</i> , 2011

Tabella 1: Specie di 'Candidatus Phytoplasma' non classificate come gruppo o sottogruppo ribosomico.

A queste specie ufficialmente pubblicate vanno aggiunte altre 5: 'Ca. P. vitis', 'Ca. P. palmae', 'Ca. P. luffae', 'Ca. P. cocostanzianae', 'Ca. P. cocosnigeriae' (IRPCM, 2004), che furono proposte nel 1994 a Bordeaux (Francia) al decimo congresso internazionale dell'IOM ("International Organization of Mycoplasmaology"), ma che non sono state ancora formalmente descritte.

1.3 SCOPO DEL PRESENTE LAVORO

Lo scopo del presente lavoro è stato quello di indagare alcuni aspetti epidemiologici del fitoplasma agente del giallume dell'astro in colza. In particolare è stato studiato:

- la presenza e l'incidenza delle piante sintomatiche in coltivazioni di colza invernale
- il ruolo nella diffusione dell'agente fitopatogeno di cicadellidi catturati nei od in prossimità degli appezzamenti
- l'identificazione dei fitoplasmi in piante sintomatiche ed insetti catturati
- la possibilità di trasmissione del fitoplasma del giallume dell'astro (16SrI-B) e/o di stolbur (16SrXII-A) attraverso il seme in colza.

CAP. 2: MATERIALI E METODI

2.1 INDAGINI EPIDEMIOLOGICHE

2.1.1 Osservazioni sintomi in campo

Durante la primavera 2009 in coltivazioni di colza invernale da olio, allestite presso l'Azienda agraria sperimentale «L. Toniolo» dell'Università di Padova (Foto 2) sono stati osservati dei sintomi ascrivibili alla presenza di fitoplasmi su colza. A seguito di queste segnalazioni il Dipartimento di agronomia ambientale e produzioni vegetali dell'Università di Padova, in collaborazione con il Dipartimento di scienze agrarie dell'Università di Bologna, ha avviato un'attività di monitoraggio della malattia.

Le osservazioni dei campioni esaminati in questo elaborato sono state effettuate durante i mesi primaverili nel 2012 su piante seminate nell'autunno del 2011. Su alcune piante sintomatiche sono state condotte delle indagini molecolari per l'identificazione del fitoplasma.

L'attività di controllo ha interessato molte cultivar di colza appartenenti a diverse tipologie genetiche (ibridi CHH, ibridi CHH semi-dwarf, CHL e linee a impollinazione libera) e qualitative (LEAR e HEAR, rispettivamente a basso ed alto contenuto di acido erucico nell'olio). L'itinerario tecnico di coltivazione adottato nelle prove sperimentali ha previsto l'applicazione di una strategia di riduzione degli input agronomici con tecniche di lavorazione ridotta e con un limitato apporto di nutrienti minerali (60 kg ha^{-1} di fosforo e potassio e 80 kg ha^{-1} di azoto). La semina è avvenuta l'ultima decade di settembre del 2011 con una distanza interfilare di 45 cm. e con investimenti pari a 76 semi m^{-2} per gli ibridi semi-nani e a 56 semi m^{-2} per le cultivar a taglia normale. I campi sperimentali oggetto della raccolta dei campioni vegetali sono orientati a ovest e sono delimitati da capezzagne interne ed esterne.

2.1.2 Cattura ed identificazione insetti potenziali vettori

Durante il mese di giugno 2012 sono stati prelevati presso le cappezzagne e le strade di campagna limitrofe ai campi coltivati a colza dell'azienda agraria sperimentale "L. Toniolo" dell'università degli studi di Padova (Foto 2) insetti che per le loro caratteristiche morfo-anatomiche possono trasmettere i fitoplasmi associati alla malattia. Dato l'elevato sviluppo vegetativo e la densità delle piante, non è stato possibile indagare la presenza di questi omotteri all'interno degli appezzamenti.

Per la raccolta è stato usato un retino da sfalcio entomologico in alluminio dotato di sacco in cotone molto resistente. Gli insetti catturati sono stati trasferiti all'interno di barattoli contenenti alcool al 75% tramite l'impiego di un aspiratore entomologico

Per l'identificazione degli insetti sono state utilizzate le seguenti chiavi dicotomiche:

- Ossiannilsson (1978, 1981, 1983),
- Ribaut (1936, 1952),
- Della Giustina (1989).

previa estrazione degli organi genitali maschili.



Foto 2: mappa dell'azienda agraria sperimentale "L. Toniolo" dell'università degli studi di Padova con evidenziati siti di monitoraggio

2.2 INDAGINI MOLECOLARI (analisi di laboratorio)

2.2.1 Estrazione del DNA da materiale vegetale

Il DNA totale è stato estratto da diverse strutture vegetative (germogli, nervature, piccioli) partendo da 1 grammo di tessuto e adoperando il protocollo di estrazione per gli acidi nucleici che prevede l'impiego di CTAB 3% buffer. Poiché i risultati non sono stati soddisfacenti perché il materiale di partenza era troppo poco (tessuti molto ricchi di acqua) si è deciso quindi di estrarre il DNA totale partendo da 2 grammi di tessuto vegetale utilizzando un Kit commerciale che prevede l'impiego di colonnine d'estrazione (MACHEREY-NAGEL).

DESCRIZIONE PROTOCOLLO D'ESTRAZIONE CON COLONNINE

La procedura è divisa in sette fasi di seguito riportate:

1. Omogeneizzazione del campione: da ogni pianta viene preparato un campione formato da 2 gr di tessuto vegetale, costituito da nervature e/o tessuto floematico e i campioni vengono polverizzati in mortai sterili con l'aiuto di pestelli e azoto liquido.
2. Lisi cellulare: trasferire la polvere risultante in una nuova provetta e aggiungere 400 μ l di buffer PL1 in dotazione; agitare molto bene la provetta. Aggiungere 10 μ l di RNase tipo A e mescolare bene. Incubare la sospensione per 10 minuti a 65°C.
3. Filtrazione della sospensione grezza: prendere le provette con filtro viola e inserirle in un nuovo tubo di raccolta (2 ml); caricare la sospensione nel filtro viola, centrifugare per 2 minuti a 11.000 giri/minuto. Al termine raccogliere la sospensione e buttare via il filtro usato. (Se durante la centrifugazione il liquido non è passato tutto ripetere l'operazione).
4. Creare la condizione di legame del DNA: alla soluzione raccolta aggiungere 450 μ l di buffer PC in dotazione e mescolare bene.
5. Filtrazione della sospensione: prendere la provetta con filtro verde e inserirla in un nuovo tubo di raccolta (2ml); caricare la sospensione nel filtro verde (massimo 700 μ l), centrifugare per 1 minuto a 11.000 giri/minuto e al termine eliminare la sospensione filtrata.
6. Lavaggio della membrana di silice: I) Inserire la provetta con il filtro verde all'interno di un tubo di raccolta e aggiungere 400 μ l di buffer PW1; centrifugare per 1 minuto a 11.000 giri/minuto. Al termine gettare il liquido filtrato. II) Inserire la provetta con il filtro verde all'interno di un tubo di raccolta e aggiungere 700 μ l di buffer PW2; centrifugare per 1 minuto a 11.000 giri/minuto. Al termine gettare il liquido filtrato. III) Inserire la provetta con il filtro verde all'interno di un tubo di raccolta e aggiungere 200 μ l di buffer PW2; centrifugare per 2 minuti a 11.000 giri/minuto. Al termine gettare il liquido filtrato.

7. DNA: prendere la provetta con filtro verde e inserirla in un nuovo tubo di raccolta (1.5 ml). Aggiungere 50 μ l di tampone PE e incubare per 5 minuti a 65°C. Al termine centrifugare per 1 minuto a 11000 giri/minuto. Ripetere l'operazione 2 volte.

DESCRIZIONE PROTOCOLLO D'ESTRAZIONE CON CTAB 3% BUFFER

La procedura è divisa in dodici fasi di seguito riportate:

1. Dopo aver triturato i campioni con pestello e azoto liquido aggiungere 7 ml (200 μ l per gli insetti) di tampone CTAB 3% (aggiungere l'antiossidante 2 mercaptoetanololo 0.2% all'ultimo momento).
2. Omogeneizzare i campioni e trasferire 1 ml in eppendorf da 2 ml.
3. Mettere ad incubare per 20 minuti a 65°C.
4. Aggiungere 1 ml (200 μ l per gli insetti) di cloroformio, mescolare bene e al termine centrifugare per 10 minuti a 11.000 giri/minuto.
5. Trasferire il sopranatante in Eppendorf da 2 ml; aggiungere 1 ml (200 μ l per gli insetti) di isopropanolo e mescolare bene.
6. Porre i campioni in freezer a -20°C per 5 minuti.
7. Centrifugare per 15 minuti a 11.000 giri/minuto.
8. Gettare l'isopropanolo facendo attenzione di non gettare via il pellet.
9. Aggiungere al pellet 1 ml di etanolo 70%.
10. Centrifugare per 5 minuti a 11.000 giri/minuto.
11. Far asciugare il pellet a temperatura ambiente.
12. Aggiungere 50 μ l di TE e mettere in frigo.

2.2.2 Estrazione DNA da insetti

Il DNA totale è stato estratto dal corpo degli insetti (cicaline) adoperando il protocollo a base di CTAB buffer riducendo i volumi dei reagenti, come riportato nella precedente descrizione.

2.2.3 Amplificazione genica (PCR)

La reazione di PCR nota come amplificazione genica, è un metodo di individuazione di porzione di acidi nucleici molto sensibile (Chen *et al.*, 1993) perché permette di evidenziare la presenza di fitoplasmi anche quando si trovano a basse concentrazioni all'interno del floema.

Questa metodologia permette di produrre, in un tempo relativamente breve, un elevatissimo numero di molecole di acido nucleico identiche tra loro e alla molecola di partenza che funge da stampo per la replicazione. Perché tale reazione avvenga, l'enzima polimerasi deve avere a disposizione una miscela di DNA denaturato, a singola elica, ottenuto mediante innalzamento della temperatura a 94°C. Dopo la denaturazione del DNA a doppia elica, l'innesco della reazione è rappresentato da una coppia di oligonucleotidi sintetici detti "primer", i quali si appaiono ("annealing") per omologia alle molecole di DNA bersaglio ("template"). Nucleotidi trifosfati d-ATP, d-GTP, d-CTP e dTTP, sono necessari nella miscela di reazione per la sintesi di nuovo DNA, infine precise condizioni chimico-fisiche favoriscono l'amplificazione.

L'aumento esponenziale del quantitativo di molecole di DNA è possibile grazie alla ripetizione ciclica delle fasi di denaturazione del DNA stampo, di "annealing" degli oligonucleotidi al "template" e di allungamento o sintesi della catena nucleotidica ad opera della polimerasi.

Per gli esperimenti di PCR si è utilizzato un termociclatore con il quale vengono eseguiti 35 cicli di amplificazione, ciascun ciclo è composto da:

- Denaturazione, 94°C per un minuto
- Accoppiamento dei primer, 55°C per 2 minuti
- Sintesi nuovo filamento, 72°C per 3 minuti (esteso a 10 minuti nell'ultimo ciclo)

Perché la reazione avvenga occorrono determinate condizioni, le più importanti sono la sterilità e la buona manualità dell'operatore che provvede alla realizzazione della miscela di reazione.

La miscela in un volume totale di 24 µl, è costituita da:

- 17,5 µl acqua deionizzata, distillata, sterilizzata e filtrata;
- 2,5 µl 10X RedTaq PCR “buffer” (Sigma);
- 2 µl d-NTP 2,5 mM;
- 0,5 µl “primer forward” 20 µM;
- 0,5 µl “primer reverse” 20 µM;
- 1 µl RED taq DNA Polimerasi (Sigma) 1 U/µl

La miscela contenuta in provette Eppendorf sterili a parete sottile, viene poi coperta con l’aggiunta di olio minerale per evitarne l’evaporazione durante le fasi di riscaldamento previste dal programma.

Per gli esperimenti di PCR si sono utilizzati “primer” che amplificano porzioni altamente conservate dell’acido nucleico ribosomico nella sua componente 16S (Lee *et al.*, 1993; Schneider *et al.*, 1993; Namba *et al.*, 1993) seguendo i parametri pubblicati (Schaff *et al.*, 1992). In particolare è stata effettuata una prima amplificazione diretta impiegando gli oligonucleotidi universali P1A/P7A (Lee *et al.*, 2004a) che amplificano un frammento di circa 1.800 nucleotidi (PCR diretta) del gene ribosomico che si estende dall’estremità 5' del gene codificante il 16S rRNA all’estremità 3' del gene codificante il 23S rRNA, includendo la regione spaziatrice o “spacer”.

Ad essa è seguita una seconda amplificazione (PCR-“nested”) effettuata sui prodotti della prima diluiti 1:30 con acqua sterile. In questa seconda reazione sono stati impiegati gli oligonucleotidi universali R16F2/R2 (Lee *et al.*, 1995) che amplificano un frammento di circa 1.200 nucleotidi interno al precedente.

La terza amplificazione PCR-“second nested” è stata effettuata con la coppia di “primer” universali 16R758f/16R1232r (=M1/M2) (Gibb *et al.*, 1995) che amplificano un frammento di circa 500 nucleotidi.

Le sequenze delle coppie di oligonucleotidi usate per l’amplificazione sono:

P1A/P7A (Lee *et al.*, 2004)

P1A 5’-ACG CTG GCG GCG CGC CTA ATA-3’

P7A 5’-CCT TCA TCG GCT CTT AGT GC-3’

R16F2/R2(Lee *et al.*, 1995)

R16F2 5'- ACG ACT GCT AAG ACT GG-3'

R16R2 5'-TGA CGG GCG GTG TGT ACA AAC CCC G-3'

16R758/16R1232r= M1/M2 (Gibb *et al.*, 1995)

M1 5'- GTC TTT ACT GAC GCT GAG GC-3'

M2 5'- CTT CAG CTA CCC TTT GTA AC-3'

Al termine dell'amplificazione, aliquote di 6 µl di ogni campione sono state sottoposte ad elettroforesi orizzontale in gel di agarosio 1% in tampone TA (TRIS-acetato 1,04 M, EDTA 0,002 M) in celle BIORAD, con alimentatore Bio-Rad Mod. PowerPac 300. L'elettroforesi è stata effettuata a 150 Volt per circa 30 minuti ed ai campioni non è stato aggiunto il colorante, essendo questo già presente nella REDtaq è risultato efficace per controllare la corsa dell'acido nucleico durante l'elettroforesi.

Come standard per verificare la lunghezza dei frammenti amplificati è stato posto in uno dei pozzetti il "marker" 1 kb DNA ladder.

Successivamente la visualizzazione della reazione è stata eseguita con colorazione al bromuro di etidio 1% in acqua per 10 minuti, a cui è seguito un passaggio in acqua per altri 10 minuti ed infine l'osservazione e foto agli ultravioletti.

La molecola di etidio di bromuro si intercala tra le basi impilate del DNA a doppio filamento, le molecole quindi emettono luce fluorescente se irradiate con luce ultravioletta; i frammenti amplificati perciò appaiono sul gel come bande chiare su sfondo scuro.

2.2.4 Analisi del polimorfismo della lunghezza dei frammenti di restrizione (RFLP)

Questa tecnica se applicata a sequenze di acido nucleico altamente conservate come quelle impiegate nella presente sperimentazione, permette di caratterizzare molecolarmente il patogeno e quindi ottenere una sua preliminare identificazione.

La digestione del prodotto di PCR avviene aggiungendo un'aliquota del prodotto amplificato alla seguente miscela:

9,75 µl acqua distillata e sterilizzata;

2 µl buffer fornito con l'enzima;

0,25 µl enzima di taglio;

In questo lavoro è stato impiegato l'enzima *TruII*.

Al fine di analizzare i profili di restrizione, sono stati utilizzati i prodotti amplificati di DNA di fitoplasmi di circa 500 nucleotidi ottenuti dopo PCR-“second nested” con gli oligonucleotidi M1/M2 digeriti con l'enzima di restrizione *TruII* a 65°C per 10 minuti.

Per evidenziare le bande derivate dalla digestione enzimatica è stata effettuata un'elettroforesi verticale dei campioni in gel di poliacrilammide al 5% TBE.

La corsa elettroforetica è avvenuta mediante l'uso del medesimo alimentatore usato per i prodotti PCR, ma a 250 Volt per 30 minuti circa. Colorazione in bromuro di etidio e fotografia ad ultravioletti hanno permesso di osservare i risultati e di compararli fra loro.

Attraverso un confronto dei profili ottenuti, con quelli di ceppi di fitoplasmi noti; sappiamo dire a quale gruppo di appartenenza corrispondono i profili riscontrati con le analisi.

2.3 Prova di trasmissione del fitoplasma attraverso il seme di propagazione

La sperimentazione è stata condotta durante la stagione vegetativa 2011 presso una serra coperta con rete a prova di insetto dislocata presso l'azienda sperimentale “L. Toniolo” dell'università di Padova (Foto 3). E' stata saggiata la possibilità di trasmissione del fitoplasma via seme in tre diverse cultivar (PR45D01-EXCALIBUR-CATALINA). Per ogni cv indagata è stato impiegato il seme:

- commerciale utilizzato per la semina nel 2008 e 2009
- raccolto da piante sintomatiche nel 2010
- raccolto da piante NON sintomatiche nel 2010

La semina è avvenuta il 25 marzo 2011 in alveoli contenente terriccio sterile (Foto 4). A 3, 7, 15, 30 e 45 giorni dall'emergenza sono stati effettuati controlli visivi per osservare l'insorgenza di sintomi ascrivibili a giallume e sono state prelevate delle plantule al fine di misurarne il peso (come indice vegetativo) e per condurre le indagini molecolari (PCR/RFLP) volte a verificare la presenza dei fitoplasmi.



Foto. 3: Serra



Foto. 4: Plantule germinate

CAP. 3: RISULTATI

3.1 INDAGINI EPIDEMIOLOGICHE

3.1.1 Osservazioni sintomi in campo

Nei campi sperimentali utilizzati per le indagini sono state osservate piante con sintomi ascrivibili a giallume. Le piante si presentavano di taglia maggiore rispetto a quelle sane, mostrando evidenti fenomeni di scopazzo (Foto 5) derivanti dalla perdita di dominanza apicale dei racemi fiorali. A livello fogliare, le lamine manifestavano un'intensa e disomogenea colorazione rossastra, mentre i fiori esibivano estese malformazioni riconducibili a fenomeni di fillodia. La differenziazione di ammassi fogliari in sostituzione dei petali (Foto 6 e 7), ha compromesso la fertilità delle infiorescenze e il successivo sviluppo di silique e semi. Le poche fruttificazioni formatesi presentavano dimensioni ridotte ed alterazioni morfologiche (Foto 8), mentre i semi eventualmente prodotti apparivano striminziti e scarsamente germinabili (Foto 9).



Foto 5: Formazione di scopazzi



Foto 6: Malformazioni fiorali



Foto 7: Infiorescenze sintomatiche



Foto 8: Silique piccole malformate



Foto 9: Semi piccoli e di scarsa qualità prodotti dalle piante sintomatiche a sinistra, rispetto a quelli prodotti da piante sane a destra

La percentuale di piante colpite è risultata inferiore all'1% ed ha interessato tutte le cv presenti negli appezzamenti, confermando quanto riportato in Rampi *et al.*, (2010). Le analisi molecolari condotte sulle piante sintomatiche hanno confermato la presenza di “*Candidatus Phytoplasma asteris*” sottogruppo ribosomico 16SrI-B.

3.1.2 Cattura ed identificazione insetti potenziali vettori

Complessivamente sono stati catturati 132 insetti, 88 femmine e 44 maschi. Sono stati rilevati i generi *Chiasmus*, *Euscelidius*, *Macrosteles*, *Psammotettix* e *Recilia*, della famiglia dei Cicadellidi; *Laodelphax* e *Toya* appartenenti ai Delfacidi ed il genere *Cixius* appartenente alla famiglia dei Cixiidi (Tabella 2).

Per quanto riguarda la positività degli insetti catturati, dalle analisi molecolari condotte è emerso che in 25 insetti (3 *Psammotettix alienus*, 1 *Toya propinqua*, 2 *Psammotettix confinis*, 18 *Psammotettix striatus*, 1 *Macrosteles quadripunctulatus*) sono stati identificati fitoplasmi appartenenti al gruppo ribosomico 16SrI (giallume dell'astro) e 16SrIII (malattia X del pesco) (Figure 2, 3 e Tabella 3).

N. tubo Eppendorf	Data Prelievo in campo	Genere	Specie	N° insetti
1	22/06/2012	<i>Chiasmus</i>	<i>conspurcatus</i>	3
2	22/06/2012	<i>Psammottetix</i>		1
3	22/06/2012	<i>Psammottetix</i>	<i>alienus</i>	6
4	22/06/2012	<i>Psammottetix</i>	<i>striatus</i>	1
5	22/06/2012	<i>Psammottetix</i>		5
6	22/06/2012	<i>Psammottetix</i>	<i>striatus</i>	2
7	22/06/2012	<i>Psammottetix</i>		6
8	22/06/2012	<i>Euscelidius</i>	<i>variegatus</i>	1
9	22/06/2012	<i>Macrosteles</i>		3
10	25/06/2012	<i>Psammottetix</i>	<i>alienus</i>	1
11	25/06/2012	<i>Psammottetix</i>		1
12	25/06/2012	<i>Recilia</i>	<i>schmidtgeni</i>	1
13	25/06/2012	<i>Psammottetix</i>	<i>alienus</i>	2
14	25/06/2012	<i>Psammottetix</i>	<i>confinis</i>	1
15	25/06/2012	<i>Psammottetix</i>		9
16	21/06/2012	<i>Psammottetix</i>	<i>striatus</i>	1
17	21/06/2012	<i>Psammottetix</i>		11
18	21/06/2012	<i>Recilia</i>	<i>schmidtgeni</i>	1
19	21/06/2012	<i>Psammottetix</i>		2
20	20/06/2012	<i>Psammottetix</i>	<i>alienus</i>	5
21	19/06/2012	<i>Psammottetix</i>		3
22	19/06/2012	<i>Psammottetix</i>		7
23	19/06/2012	<i>Psammottetix</i>	<i>alienus</i>	1
24	19/06/2012	<i>Psammottetix</i>		1
25	19/06/2012	<i>Euscelidius</i>	<i>variegatus</i>	2
26	19/06/2012	<i>Laodelphax</i>	<i>striatellus</i>	1
27	19/06/2012	<i>Toya</i>	<i>propinqua</i>	1
28	19/06/2012	<i>Psammottetix</i>		1
29	19/06/2012	<i>Laodelphax</i>	<i>striatellus</i>	1
30	22/06/2012	<i>Psammottetix</i>	<i>alienus</i>	3
31	22/06/2012	<i>Psammottetix</i>	<i>confinis</i>	2
32	22/06/2012	<i>Psammottetix</i>	<i>striatus</i>	1
33	22/06/2012	<i>Psammottetix</i>		3
34	22/06/2012	<i>Psammottetix</i>		5
35	25/06/2012	<i>Psammottetix</i>	<i>alienus</i>	2
36	25/06/2012	<i>Psammottetix</i>	<i>striatus</i>	1
37	25/06/2012	<i>Psammottetix</i>		9
38	20/06/2012	<i>Psammottetix</i>		4
39	20/06/2012	<i>Psammottetix</i>		7
40	21/06/2012	<i>Psammottetix</i>		2
41	21/06/2012	<i>Psammottetix</i>		4
42	21/06/2012	?		1
43	21/06/2012	<i>Chiasmus</i>	<i>conspurcatus</i>	3
44	21/06/2012	<i>Psammottetix</i>		1
45	21/06/2012	?		1
46	21/06/2012	<i>Macrosteles</i>	<i>quadripunctulatus</i>	1
47	21/06/2012	<i>Cixius</i>		1

Tabella 2: Numero e classificazione degli insetti catturati

N. tubo Eppendorf	Genere	Specie	Gruppo ribosomico dei fitoplasmi identificati
1	<i>Chiasmus</i>	<i>conspurcatus</i>	
2	<i>Psammottetix</i>		
3	<i>Psammottetix</i>	<i>alienus</i>	
4	<i>Psammottetix</i>	<i>striatus</i>	
5	<i>Psammottetix</i>		
6	<i>Psammottetix</i>	<i>striatus</i>	
7	<i>Psammottetix</i>		
8	<i>Euscelidius</i>	<i>variegatus</i>	
9	<i>Macrosteles</i>		
10	<i>Psammottetix</i>	<i>alienus</i>	
11	<i>Psammottetix</i>		
12	<i>Recilia</i>	<i>schmidtgeni</i>	
13	<i>Psammottetix</i>	<i>alienus</i>	
14	<i>Psammottetix</i>	<i>confinis</i>	
15	<i>Psammottetix</i>		
16	<i>Psammottetix</i>	<i>striatus</i>	
17	<i>Psammottetix</i>		
18	<i>Recilia</i>	<i>schmidtgeni</i>	
19	<i>Psammottetix</i>		
20	<i>Psammottetix</i>	<i>alienus</i>	16SrI-B
21	<i>Psammottetix</i>		
22	<i>Psammottetix</i>		
23	<i>Psammottetix</i>	<i>alienus</i>	
24	<i>Psammottetix</i>		
25	<i>Euscelidius</i>	<i>variegatus</i>	
26	<i>Laodelphax</i>	<i>striatellus</i>	
27	<i>Toya</i>	<i>propinqua</i>	16SrI
28	<i>Psammottetix</i>		
29	<i>Laodelphax</i>	<i>striatellus</i>	
30	<i>Psammottetix</i>	<i>alienus</i>	16SrIII-A
31	<i>Psammottetix</i>	<i>confinis</i>	
32	<i>Psammottetix</i>	<i>striatus</i>	
33	<i>Psammottetix</i>		16SrIII-A
34	<i>Psammottetix</i>		
35	<i>Psammottetix</i>	<i>alienus</i>	
36	<i>Psammottetix</i>	<i>striatus</i>	16SrI-B
37	<i>Psammottetix</i>		
38	<i>Psammottetix</i>		
39	<i>Psammottetix</i>		
40	<i>Psammottetix</i>		16SrIII-A
41	<i>Psammottetix</i>		
42	?		
43	<i>Chiasmus</i>	<i>conspurcatus</i>	
44	<i>Psammottetix</i>		
45	?		
46	<i>Macrosteles</i>	<i>quadripunctulatus</i>	16SrI-B
47	<i>Cixius</i>		

Tabella 3: Risultati analisi molecolari PCR/RFLP sugli insetti catturati.

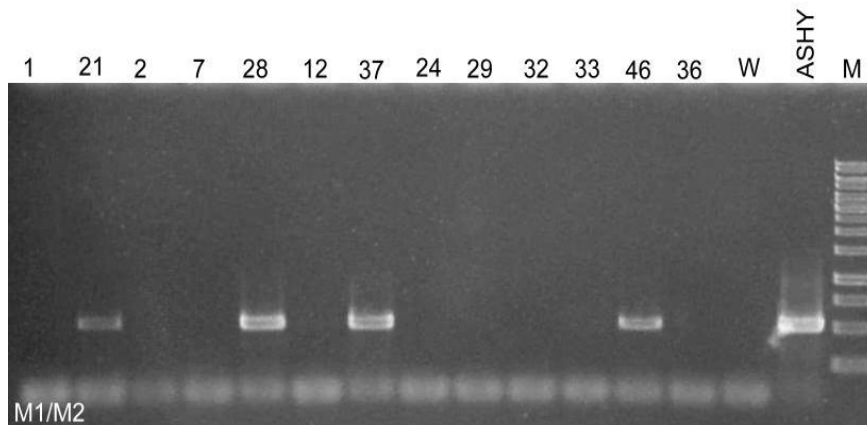


Fig. 2: Gel di agarosio all'1% dei prodotti di amplificazione in "nested" PCR utilizzando i "primer" generici M1/M2 sui campioni provenienti da Padova (PD). M, marker 1kb DNA ladder, lunghezza delle bande in nucleotidi; 10.000, 8.000, 6.000, 5.000, 4.000, 3.500, 2.500, 2.000, 1.500, 1.000, 750, 500, 250. W, acqua distillata sterile, ASHY controllo positivo, sottogruppo ribosomico 16SrVII-A, 1, 21, 2, 7, 28, 12, 37, 24, 29, 32, 33, 46, 36, campioni positivi.

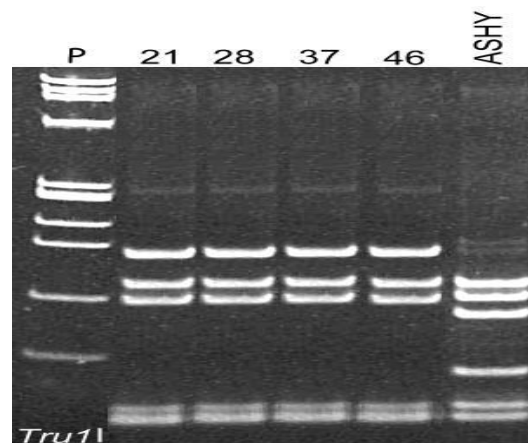


Fig. 3: Gel al 7% di poliacrilammide dei profili di restrizione dei prodotti di amplificazione ottenuti con i "primer" M1/M2 tagliati con l'enzima di restrizione *TruI*. P "marker" Φ X174 con lunghezza delle bande in nucleotidi: 1.353, 1.078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118, 72. ASHY controllo positivo, sottogruppo ribosomico 16SrVII-A, 21, 28, 37, 46 campioni positivi.

3.3 TRASMISSIONE DEL FITOPLASMA ATTRAVERSO IL SEME

I dati raccolti evidenziano che i semi derivanti da piante sintomatiche hanno una minore capacità di germogliare rispetto a quelli delle piante non sintomatiche. Infatti se complessivamente la germinabilità è stata più o meno uniforme nelle tre cv impiegate (84.1 PR45D01, 91.2 EXCALIBUR, 83.0 CATALINA) differenze sono state osservate tra i semi commerciali (93,9%) e da piante non sintomatiche (89,8%) rispetto a quelli derivanti da piante manifestanti sintomi da giallume (77,3%) (Tabella 4).

Cultivar	Tipologia Seme impiegato	Germinabilità (%)
PR45D01	semina 2008	90,0
PR45D01	sintomatiche 2009	65,0
PR45D01	semina 2009	89,0
PR45D01	NON sintomatiche 2010	84,5
PR45D01	sintomatiche 2010	92,0
EXCALIBUR	semina 2008	95,5
EXCALIBUR	sintomatiche 2009	86,5
EXCALIBUR	semina 2009	98,5
EXCALIBUR	sintomatiche 2010	82,5
EXCALIBUR	NON sintomatiche 2010	93,0
CATALINA	semina 2009	96,5
CATALINA	sintomatiche 2010	60,5
CATALINA	NON sintomatiche 2010	92,0

Tabella 4: Percentuale di emergenza ottenuta dai diversi semi nella prova di trasmissione del fitoplasma via seme

Per quanto riguarda l'influenza della provenienza del seme sullo sviluppo della plantula, dai dati raccolti non si evidenzia alcuna differenza nel peso della massa vegetativa; le plantule da seme da piante sintomatiche hanno lo stesso sviluppo di quelle provenienti da seme raccolto da piante non sintomatiche (Tabella 5 e grafico 1).

Cultivar	Tipologia Seme impiegato	30-mar (3 E)	04-apr (7 E)	11-apr (14 E)	21-apr (30 E)	10-mag (50 E)
PR45D01	semina 2008	0,18	0,21	0,41	2,05	6,20
PR45D01	sintomatiche 2009	0,17	0,16	0,22	2,06	4,10
PR45D01	semina 2009	0,24	0,21	0,59	1,73	4,10
PR45D01	non sintomatiche 2010	0,21	0,17	0,47	2,41	5,10
PR45D01	sintomatiche 2010	0,27	0,27	0,35	2,16	9,00
EXCALIBUR	semina 2008	0,59	0,26	0,65	1,40	4,70
EXCALIBUR	sintomatiche 2009	0,31	0,26	0,41	2,42	5,30
EXCALIBUR	semina 2009	0,52	0,18	0,55	1,26	3,60
EXCALIBUR	sintomatiche 2010	0,20	0,22	0,26	2,04	5,90
EXCALIBUR	non sintomatiche 2010	0,25	0,27	0,46	1,90	6,20
CATALINA	semina 2009	0,25	0,25	0,77	1,33	7,20
CATALINA	sintomatiche 2010	0,24	0,19	0,37	1,40	3,80
CATALINA	non sintomatiche 2010	0,26	0,26	0,46	0,91	5,60

Tabella 5: Peso unitario (g) delle singole plantule ottenute dai diversi semi della prova di trasmissione del fitoplasma nelle diverse date espresse anche come giorni dall'emergenza

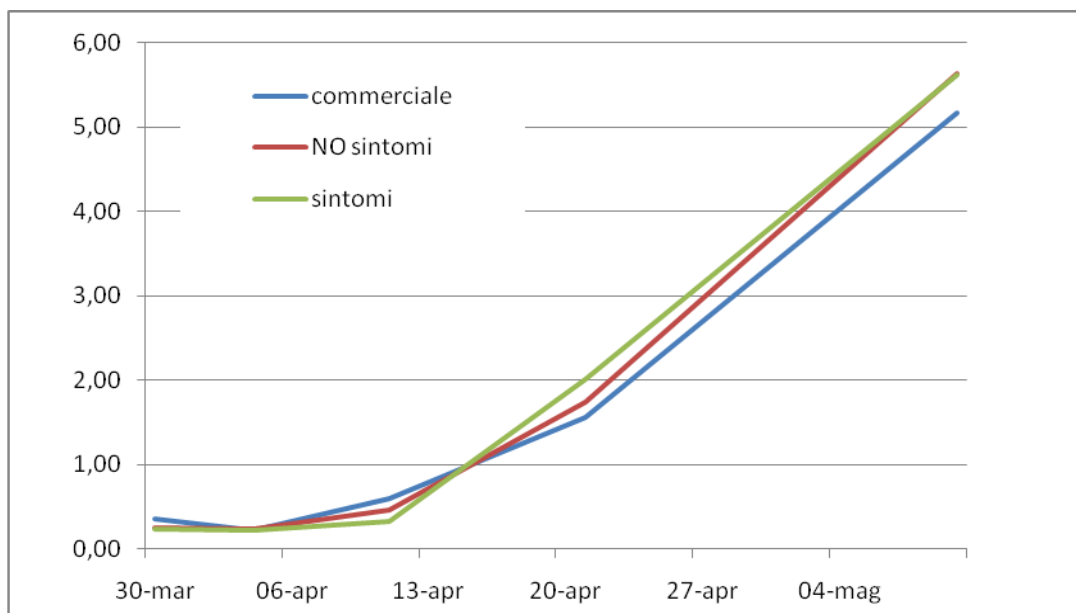


Grafico 1: sviluppo dei vari tipi di seme.

Dalla analisi molecolari condotte sulle plantule ottenute dai semi di diversa provenienza, emerge che il 40% dei campioni derivanti da seme commerciale o da seme proveniente da piante infette è risultato positivo alla presenza di fitoplasmi, contro il 22% di quello proveniente da piante asintomatiche (Figure 4-5 e Tabella 6).

Cultivar	Tipologia Seme impiegato	04-apr (7 E)	11-apr (14 E)	21-apr (30 E)
PR45D01	semina 2008	neg	neg	16SrI
PR45D01	sintomatiche 2009	neg	neg	neg
PR45D01	semina 2009	neg	neg	16SrI
PR45D01	NON sintomatiche 2010	16SrI	neg	neg
PR45D01	sintomatiche 2010	neg	neg	16SrI
EXCALIBUR	semina 2008	16SrI	16SrI	neg
EXCALIBUR	sintomatiche 2009	16SrXII-A	neg	16SrI
EXCALIBUR	semina 2009	16SrI	neg	16SrI
EXCALIBUR	sintomatiche 2010	neg	neg	16SrI
EXCALIBUR	NON sintomatiche 2010	neg	neg	neg
CATALINA	semina 2009	neg	neg	neg
CATALINA	sintomatiche 2010	16SrI	neg	16SrI
CATALINA	NON sintomatiche 2010	16SrI	neg	neg

Tabella 6: risultato analisi sulle plantule nate dai diversi semi impiegati nella prova di trasmissione del fitoplasma via seme di colza.

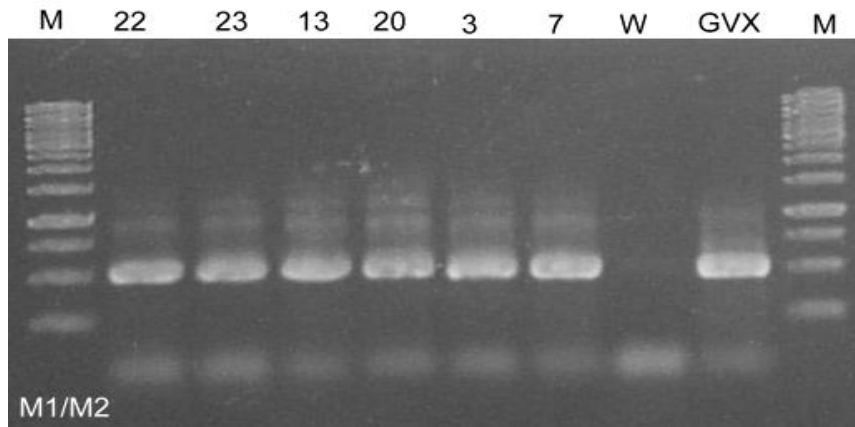


Fig. 4: Gel di agarosio all'1% dei prodotti di amplificazione in "nested" PCR utilizzando i "primer" generici M1/M2 sui campioni provenienti da Padova (PD). M, marker 1kb DNA ladder, lunghezza delle bande in nucleotidi; 10.000, 8.000, 6.000, 5.000, 4.000, 3.500, 2.500, 2.000, 1.500, 1.000, 750, 500, 250. W, acqua distillata sterile, GvX controllo positivo, sottogruppo ribosomico 16SrIII-A, 22, 23, 13, 20, 3, 7, campioni positivi al giallume dell'astro.

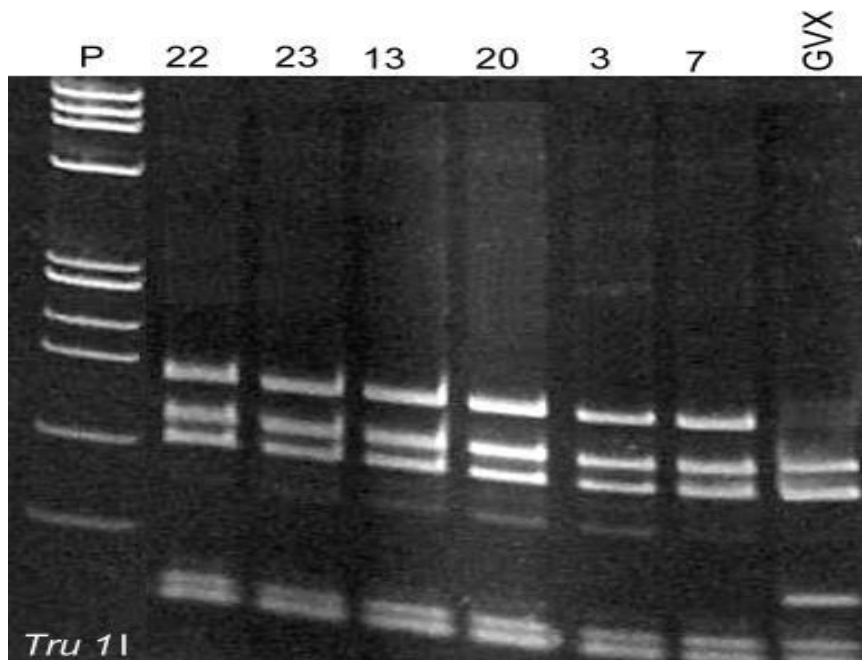


Fig. 5: Gel al 7% di poliacrilammide dei profili di restrizione dei prodotti di amplificazione ottenuti con i "primer" M1/M2 tagliati con l'enzima di restrizione *TruI*. P "marker" Φ X174 con lunghezza delle bande in nucleotidi: 1.353, 1.078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118, 72, GvX controllo positivo, sottogruppo ribosomico 16SrIII-A, 22, 23, 13, 20, 3, 7, campioni positivi.

CAP. 4: CONCLUSIONI

Nel presente lavoro sono stati studiati alcuni aspetti epidemiologici del fitoplasma agente del giallume dell'astro in colza.

Dalle indagini condotte in pieno campo emerge che la malattia è diffusa ma con percentuali di incidenza molto bassa tale da non compromettere la resa della coltura. Inoltre sono stati catturati molti insetti appartenenti all'ordine degli omotteri che sono risultati positivi alle analisi molecolari. Ulteriori indagini e prove di trasmissione dirette da pianta infetta a pianta sana sono necessarie per verificare la reale infettività di queste specie.

Le piante infette da fitoplasmi sono risultate capaci di portare a termine la produzione di seme, seppur a livello qualitativo e quantitativo inferiore a piante sane.

I risultati ottenuti dalla prova di trasmissione del fitoplasma del giallume dell'astro (16SrI-B) via seme hanno confermato l'assenza di correlazione tra vigore e sviluppo vegetativo delle plantule figlie con lo stato sanitario delle piante madri. Solo i dati relativi alle percentuali di germogliamento riportati da precedenti lavori sono discordanti con quelli ottenuti con la presente ricerca che evidenziano una riduzione delle germinabilità dei semi provenienti da piante sintomatiche.

Con il presente lavoro è stata confermata la capacità di trasmissione via seme del fitoplasma del giallume dell'astro (16SrI-B) anche se ulteriori indagini sono necessaria per definire l'importanza epidemiologica di questa trasmissione nella diffusione della fitoplasmosi.

CAP. 5: BIBLIOGRAFIA

- Alma A., Bosco D., Danielli A., Bertaccini A., Vibio M., Arzone A. 1997. Identification of phytoplasmas in eggs, nymphs and adults of *Scaphoideus titanus* Ball reared on healthy plants. *Insect Molecular Biology*, 6: 115-121.
- Al-Saady N.A., Khan A.J., Calari A., Al-Subhi A.M., Bertaccini A. 2008. 'Candidatus Phytoplasma omanense', a phytoplasma associated with witches' broom of *Cassia italica* (Mill.) Lam. in Oman. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58: 461-466.
- Alvarez E., Mejía J.F., Llano G.A., Loke J.B., Calari A., Duduk B., Bertaccini A. 2009. Characterization of a phytoplasma associated with frogskin disease in cassava. *Plant disease*, 93 (11): 1139-1145.
- Arocha Y., Lopez M., Pinol B., Fernandez M., Picornell B., Almeida R., Palenzuela I., Wilson M.R., Jones P. 2005. 'Candidatus Phytoplasma graminis' and 'Candidatus Phytoplasma caricae', two novel phytoplasmas associated with diseases of sugarcane, weeds and papaya in Cuba. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55 (6): 2451-2463.
- Arocha Y., Antesana O., Montellano E., Franco P., Plata G., Jones P. 2007. 'Candidatus Phytoplasma lycopersici', a phytoplasma associated with 'hoja de perejil' disease in Bolivia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(8): 1704-1710.
- Bai X, Zhang J, Ewing A, Miller S.A., Radek A.J., Shevchenko D.V., Tsukerman K., Walunas T., Lapidus A., Campbell J.W., and Hogenhout S.A. 2006. Living with genome instability: the adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts. *Journal of Bacteriology*, 188: 3682–3696.
- Barros T.S.L., Davis R.E., Resende R.O., Dally E.L. 2002. Erigeron witches' broom phytoplasma in Brazil represents new subgroup VII-B in 16S rRNA gene group vVII, the ash yellows phytoplasma group. *Plant Disease*, 86 (10): 1142-1148.
- Calari A., Paltrinieri S., Contaldo N., Sakaljeva D., Mori N., Duduk B., Bertaccini A. 2011. Molecular evidence of phytoplasmas in winter oilseed rape, tomato and corn seedlings. *Bulletin of Insectology* 64 (Supplement): S157-S158.

- Chen K.H., Guo J.R., Wu X.J., Loi N., Carraro L., Guo H.J., Chen Y.D., Osler R, Pearson R. Chen T.A. 1993. Comparison of monoclonal antibodies, DNA probes, and PCR for detection of the grapevine yellows disease agent. *Phytopathology*, 83: 915-922.
- Daire X., Boudon-Padieu E., Berville A., Schneider B., Caudwell A. 1992. Cloned DNA probes for detection of grapevine flavescence dorée mycoplasma-like organism (MLO). *Annals of Applied Biology*, 121: 95-103.
- Davis R.E., Dally E.L., Gundersen D.E., Lee I-M., Habili N. 1997. '*Candidatus* *Phytoplasma australiense*', a new phytoplasma taxon associated with Australian grapevine yellows. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47: 262-269.
- Davis R.E., Jomantiene R., Dally E.L., Wolf T.K. 1998. Phytoplasmas associated with grapevine yellows in Virginia belong to group 16SrI, subgroup A (tomato big bud phytoplasma subgroup), and group 16SrIII, new subgroup I. *Vitis*, 37: 131-137.
- Davis R.E., Dally E.L., Converse R.H. 2001. Molecular identification of a phytoplasma associated with witches'-broom disease of black raspberry in Oregon and its classification in group 16SrIII, new subgroup Q. *Plant Disease*, 85 (10): 1121.
- Della Diustina W., 1989. Homopteres Cicadellidae. Faune de France, INRA, Pariss 73, 350.
- Gibb K.S., Padovan A.C., Mogen B.D. 1995. Studies on sweet potato little-leaf phytoplasma detected in sweet potato and other plant species growing in Northern Australia. *Phytopathology*, 85: 169-174.
- Griffiths H.M., Sinclair W.A., Smart C.D., Davis R.E. 1999. The phytoplasma associated with ash yellows and lilac witches' broom: '*Candidatus* *Phytoplasma fraxini*'. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49: 1605-1614.
- Gundersen D.E, Lee I.-M., Rehner S.A., Davis R.E, Kingsbury D.T. 1994. Phylogeny of Mycoplasma-like organisms (Phytoplasmas): a basis for their classification. *Journal of Bacteriology*, 176: 5244-5254.
- Harrison N.A., Richardson P.A., Kramer J.B., Tsai J.H. 1994. Detection of the mycoplasma-like organism associated with lethal yellowing disease of palms in Florida by polymerase chain reaction. *Plant Pathology*, 43: 998-1008.

- Harrison N.A., Womack M., Carpio M.L. 2002. Detection and characterization of a lethal yellowing (16SrIV) group phytoplasma in Canary Island date palms affected by lethal decline in Texas. *Plant Disease*, 86: 676-681.
- Hiruki C., Wang K. 2004. Clover proliferation phytoplasma: '*Candidatus* Phytoplasma trifolii'. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54 (4): 1349-1353.
- Ho K., Tsai C., Chung T. 2001. Organization of ribosomal RNA genes from a loofah witches' broom phytoplasma. *DNA and Cell Biology*, 20: 115-122.
- ISTAT 2012. Superficie (ettari) e produzione (quintali): arachide, colza, girasole. www.agri.istat.it
- Jacobs K.A., Lee I-M., Griffiths H.M., Miller F.D.Jr., Bottner K.D. 2003. A new member of the clover proliferation phytoplasma group (16SrVI) associated with elm yellows in Illinois. *Plant Disease*, 87 (3): 241-246.
- Jomantiene R., Davis R.E., Dally E.L., Maas J.L. 1998a. The distinctive morphology of *Fragaria multicipita* is due to phytoplasma. *HortScience*, 33: 1069-1072.
- Jomantiene R., Davis R.E., Maas J., Dally E.L. 1998b. Classification of new phytoplasmas associated with diseases of strawberry in Florida, based on analysis of 16S rRNA and ribosomal protein gene operon sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48: 269-277.
- Jomantiene R., Maas J.L., Takeda F., Davis R.E.. 2002a. Molecular identification and classification of strawberry phylloid fruit phytoplasma in group 16SrI, new subgroup. *Plant Disease*, 86 (8): 920.
- Jung H-Y., Sawayanagi T., Kakizawa T., Nishigawa H., Miyata S., Oshima K., Ugaki M., Joon-Tak L., Namba S. 2002. '*Candidatus* Phytoplasma castaneae', a novel phytoplasma taxon associated with chestnut witches' broom disease. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52: 1543-1549.
- Jung H., Sawayanagi T., Kakizawa S., Nishigawa H., Wei W., Oshima K., Miyata S., Ugaki, M., Hibi T., Namba S., 2003a. '*Candidatus* Phytoplasma ziziphi', a novel phytoplasma taxon associated with jujube witches'-broom disease. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53: 1037-1041.
- Jung H.Y., Sawayanagi T., Wongkaew P., Miyata S., Ugaki M., Hibi T., Namba S. 2003b. '*Candidatus* Phytoplasma oryzae', a novel phytoplasma taxon associated

- with rice yellow dwarf disease. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53: 1925-1929.
- Lee I.-M., Davis R.E. 1992. Mycoplasmas which infect plants and insects. In: Maniloff J., McElhane R.N., Finch L.R., Baseman J.B. (eds.). *Mycoplasmas - molecular biology and pathogenesis*. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 379-390.
- Lee I-M., Hammond R.W., Davis R.E., Gundersen D.E. 1993a. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology*, 83: 834-842.
- Lee I-M., Davis R.E., Hsu H.-T. 1993b. Differentiation of strains in the aster yellows mycoplasma-like organisms strain cluster by serological assay with monoclonal antibodies. *Plant Disease*, 77: 815-817.
- Lee I-M., Bertaccini A., Vibio M., Gundersen D.E. 1995. Detection of multiple phytoplasmas in perennial fruit trees with decline symptoms in Italy. *Phytopathology*, 85: 728-735.
- Lee I-M., Pastore M., Vibio M., Danielli A., Attathom S., Davis R.E., Bertaccini A. 1997b. Detection and characterization of a phytoplasma associated with annual blue grass (*Poa annua*) white leaf disease in southern Italy. *European Journal of Plant Pathology*, 103: 251-254.
- Lee I-M., Gundersen-Rindal D., Davis R.E., Bartoszyk I.M. 1998a. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analysis of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48: 1153-1169.
- Lee I-M., Gundersen-Rindal D.E., Bertaccini A. 1998b. Phytoplasma: ecology and genomic diversity. *Phytopathology*, 88: 1359-1366.
- Lee I-M., Davis R.E., Gundersen-Rindal D.E. 2000. Phytoplasmas: phytopathogenic mollicutes. *Annual Review of Microbiology*, 56: 1593-1597.
- Lee I-M., Martini M., Bottner K.D., Dane R.A., Black M.C., Troxclair N. 2003. Ecological implications from a molecular analysis of phytoplasmas involved in an aster yellows epidemic in various crops in Texas. *Phytopathology*, 93: 1368-1377.
- Lee I-M., Gundersen-Rindal D., Davis R.E., Bottner K.D., Marccone C., Seemueller E. 2004a. '*Candidatus* Phytoplasma asteris', a novel taxon associated with aster

- yellows and related diseases. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 54: 1037-1048.
- Lee I-M., Martini M., Marcone C., Zhu S.F. 2004b. Classification of phytoplasma strains in the elm yellows group (16SrV) and proposal of '*Candidatus Phytoplasma ulmi*' for the phytoplasma associated with elm yellows. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54 (2): 337-347.
- Lee I-M., Bottner K.D., Secor G., Rivera Varas V. 2006. '*Candidatus Phytoplasma americanum*' a phytoplasma associated with a potato purple top wilt disease complex. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56: 1593-1597.
- Lee I-M., Bottner-Parker K.D., Zhao Y., Villalobos W., Moreira L. 2011. '*Candidatus Phytoplasma costaricanum*' a new phytoplasma associated with a newly emerging disease in soybean in Costa Rica. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(12): 2822-2826.
- Lee M.E., Grau C.R., Lukaesko L.A., Lee I-M. 2002. Identification of aster yellows phytoplasmas in soybean in Wisconsin based on RFLP analysis of PCR-amplified products (16S rDNAs). *Canadian Journal of Plant Pathology*, 24: 125–130.
- Malembic-Maher S., Salar P., Filippin L., Carle P., Angelini E., Foissac X. 2010. Genetic diversity of European phytoplasmas of the 16SrV taxonomic group and proposal of '*Candidatus Phytoplasma rubi*'. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, DOI 10.1099/ijs.0.025411-0, in press.
- Marcone C., Gibb K.S., Streten C., Schneider B. 2004a. '*Candidatus Phytoplasma spartii*', '*Candidatus Phytoplasma rhamnii*' and '*Candidatus Phytoplasma allocasuarinae*', respectively associated with spartium witches'-broom, buckthorn witches'-broom and allocasuarina yellows diseases. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54: 1025-1029.
- Marcone C., Schneider B., Seemüller E. 2004b. '*Candidatus Phytoplasma cynodontis*', the phytoplasma associated with Bermuda grass white leaf disease. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54: 1077-1082.
- Martini M., Lee I-M. Bottner K.D., Zhao Y., Botti S., Bertaccini A., Harrison N.A., Carraro L., Marcone C., Khan J., Osler R. 2007. Ribosomal protein gene-based filogeny for finer differentiation and classification of phytoplasmas. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57: 2037-2051.

- Mc Coy R.E., Caudwell A., Chang C.J., Chen T.A., Chiykowskyi L.N., Cousin M.T., Dale de Leeuw G.T.N., Golino D.A., Hackett K.J., Kirkpatrick B.C., Marwitz R., Petzold H., Shina R.H., Sugiura M., Whitcomb R.F., Yang I.L., Zhu B.M., Seemüller E. 1989. Plant Diseases Associated with Mycoplasma-like Organisms. In: The Mycoplasmas, vol. 5. (eds. Whitcomb R.F. e Tully J.G.). Academic Press, New York: 545-640.
- Menon K.P.V., Pandalai K.M. 1960. The coconut palm, a Monograph. Indian Central Coconut Committee. Ernakulam, India.
- Montano H.G., Davis R.E., Dally E.L., Pimentel J.P., Brioso P.S.T. 2000. Identification and phylogenetic analysis of a new phytoplasma from diseased chayote in Brazil. *Plant Disease*, 84: 429-436.
- Montano H.G., Davis R.E., Dally E.L., Hogenhout S., Pimentel J.P., Brioso P.S.T. 2001. '*Candidatus* Phytoplasma brasiliense', a new phytoplasma taxon associated with hibiscus witches' broom disease. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51: 1109-1118.
- Namba S., Kato S., Iwanami S., Oyaizu H., Shiozawa H., Tsuchizaki T. 1993. Detection and differentiation of plant-pathogenic mycoplasma-like organisms using polymerase chain reaction. *Phytopathology*, 83: 786-791.
- Olivier C., Galka B. 2008. Consequences of phytoplasma infection on canola crop production in the Canadian prairies. *Proceedings of Endure International Conference, Diversifying crop protection*, 12-15 October 2008 La Grande-Motte, France, O-47: 1-4.
- Oshima K., Kakizawa S., Nishigawa H., Jung H-Y., Wei W., Suzuki S., Arashida R., Nakata D., Miyata S., Ugaki M., Namba S. 2004. Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of a plant-pathogenic phytoplasma. *Nature Genetics*, 36: 27-29.
- Ossiannilsson F., 1978. The Auchenorrhyncha (Homoptera) of Fennoscandia and Denmark. Part 1: Introduction infraorder Fulgoromorpha. In *Fauna Entomologica Scandinavica*, Scandinavian Science Press Ltd., Copenhagen, vol. 7, part. 1, 222 pp.
- Ossiannilsson F., 1981. The Auchenorrhyncha (Homoptera) of Fennoscandia and Denmark. Part 2: The families Cicadidae, Cercopidae, Membracidae, and

- Cicadellidae (excl. Deltocephalinae). In Fauna Entomologica Scandinavica, Scandinavian Science Press LTd., Copenhagen, vol. 7, part. 2, 593 pp.
- Ossiannillson F., 1981. The Auchenorrhyncha (Homoptera) of Fennoscandia and Denmark. Part 3: The family Cicadellidae: Deltocephalinae, Catalogue, Literature and Index. In Fauna Entomologica Scandinavica, Scandinavian Science Press LTd., Copenhagen, vol. 7, part. 3, 978 pp.
- Quaglino F., Zhao Y., Casati P., Bulgari D., Bianco P.A., Wei W., Davis R.E. 2013. '*Candidatus* Phytoplasma solani' International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.
- Rampin E., Mori N., Marini L., Zanetti F., Mosca G., Contaldo N., Bertaccini A. Girolami V. 2010. First report of '*Candidatus* Phytoplasma asteris' associated with several cultivars of oilseed rape in Italy. *Informatore agrario* 17/2010
- Ribaut H., 1936 - Homoptères auchénorhynques (I. Typhlocybidae) - in: Faune de France, Paris, vol. 31, 228 pp.
- Ribaut H., 1952 - Homoptères auchénorhynques (II. Jassidae) - In: Faune de France, Paris, vol. 57, 474 pp.
- Sawayanagi T., Horikoshi N., Kanehira T., Shinohara M., Bertaccini A., Cousin M.T., Hiruki C., Namba S. 1999. '*Candidatus* Phytoplasma japonicum', a new phytoplasma taxon associated with Japanese Hydrangea phyllody. *International Journal of Bacteriology*, 49: 1275-1285.
- Schaff D.A., Lee I.-M., Davis R.E. 1992. Sensitive detection and identification of mycoplasma-like organisms by polymerase chain reactions. *Biochemistry Biophysics Research Communications*, 186: 1503-1509.
- Schneider B., Ahrens U., Kirkpatrick B.C., Seemüller E. 1993. Classification of plant-pathogenic mycoplasma-like organisms using restriction-site analysis of PCR-amplified 16S rDNA. *Journal of General Microbiology*, 139: 519-527.
- Schneider B., Seemüller E., Smart C.D., Kirkpatrick B.C. 1995. Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas. In: *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmaology*, pp. 369-380. Ed. S. Razin and J.G. Tully. San Diego, CA: Academic press.
- Schneider B., Torres E., Martin M.P., Schroder M., Behnke H.D., Seemüller E. 2005 '*Candidatus* Phytoplasma pini', a novel taxon from *Pinus silvestris* and *Pinus halepensis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55 (1): 303-307.

- Seemüller E., Schneider B., Maurer R., Ahrens U., Daire X., Kison H., Lorenz K., Firrao G., Avinent L., Sears B.B., Stackebrandt E. 1994. Phylogenetic classification of phytopathogenic mollicutes by sequence analysis of 16S ribosomal DNA. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44: 440-446.
- Seemüller E., Marcone C., Lauer U., Ragozzino A., Göschl M. 1998. Current status of molecular classification of the phytoplasmas. *Journal of Plant Pathology*, 80 (1): 3-26.
- Seemüller E., Schneider B. 2004. '*Candidatus* Phytoplasma mali', '*Candidatus* Phytoplasma pyri' and '*Candidatus* Phytoplasma prunorum', the causal agents of apple proliferation, pear decline and European stone fruit yellows, respectively. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54: 1217-1226.
- Šeruga M., Škorić D., Botti S., Paltrinieri S., Juretić N., Bertaccini A. 2003. Molecular characterization of a phytoplasma from the Aster Yellows (16Srl) group naturally infecting *Populus nigra* L. 'Italica' trees in Croatia. *Forest Pathology*, 33: 113-125.
- Tedeschi R., Ferrato V., Rossi J., Alma A. 2006. Possible Phytoplasma transovarial transmission in the psyllids *Cacopsylla melanoneura* and *Cacopsylla pruni*. *Plant Pathology*, 55: 18-24.
- Torres E., Botti S., Rahola J., Martin M.P., Bertaccini A. 2005. Grapevine yellows diseases in Spain: eight years survey of disease spread and molecular characterization of phytoplasmas involved. *Anales del Jardín botánico de Madrid*, 62 (2): 127-133.
- Valiunas D., Staniulis J., Davis R.E. 2006. '*Candidatus* Phytoplasma fragariae', a novel phytoplasma taxon discovered in yellows diseased strawberry, *Fragaria x ananassa*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56: 27-281.
- Valiunas D., Jomantiene R., Ivanauskas A., Abraitis R., Staniene G., Zhao Y, Davis R.E. 2009. First report of a new phytoplasma subgroup, 16SrIII-T, associated with decline disease affecting sweet and sour cherry trees in Lithuania. *Plant Disease*, 93 (5): 550.
- Verdin E., Salar P., Danet J.-L., Choueiri E., Jreijiri F., El Zammar S., Gélie B., Bové J. Garnier M. 2002. '*Candidatus* Phytoplasma phoenicium', a new phytoplasma associated with an emerging lethal disease of almond trees in Lebanon and Iran. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53: 833-838.

- Wei W., Davis R.E., Lee I.-M., Zhao Y. 2007. Computer-simulated RFLP analysis of 16S rRNA genes: identification of ten new phytoplasma groups. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57 (8):1855-1867.
- Weintraub P.G., Beanland L.A. 2006. Insect vectors of phytoplasmas. *Annual Review of Entomology*, 51: 91-111.
- Zanetti F., Mosca G., Loddo S. (2008)-Colza, *remunerativo ma da specialisti*. *L'Informatore Agrario*, 33: 31-36.
- Zhao Y., Sun Q., Wei W., Davis R.E., Wu W., Liu Q. 2009. '*Candidatus* Phytoplasma tamaricis', a novel taxon discovered in witches'-broom-diseased salt cedar (*Tamarix chinensis* Lour.). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59 (10): 2496-2504.
- Zreik L., Carle P., Bové J.M., Garnier M. 1995. 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'. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45: 449-453.

Allegato 1 : Classificazione fitoplasmi

Gruppi 16S rDNA	Ceppi di fitoplasmi	Numero di GenBank	Bibliografia
16SrI: Aster yellows			
I-A	Aster yellows witches' broom (AY-WB)	NC_007716	Bai et al. (2006)
I-A	Tomato big bud (BB)	L33760	Lee et al. (1992)
I-B	' <i>Candidatus</i> Phytoplasma asteris' (aster yellows, AY)	M30790	Lee et al. (2004a)
I-B	Onion yellows mild strain (OY-M)	NC_005303	Oshima et al. (2004)
I-C	Clover phyllody (CPh)	AF222065	Lee et al. (2004a)
I-D	Paulownia witches' broom (PaWB)	AY265206	Lee et al. (2004a)
I-E	Blueberry stunt (BBS3)	AY265213	Lee et al. (2004a)
I-F	Aster yellows from apricot (A-AY)	AY265211	Lee et al. (2004a)
I-I	Strawberry witches' broom (Strawb1)	U96614	Jomantiene et al. (1998a,b)
I-K	Strawberry witches' broom (strawb2)	U96616	Jomantiene et al. (1998a,b)
I-L	Aster yellows (AV2192)	AY180957	Lee et al. (2003)
I-M	Aster yellows (AVUT)	AY265209	Lee et al. (2004a)
I-N	Aster yellows (IoWB)	AY265205	Lee et al. (2004a)
I-O	Soybean purple stem (SPS)	AF268405	Lee et al. (2002)
I-P	Aster yellows from <i>Populus</i>	AF503568	Seruga et al. (2003)
I-Q	Cherry little leaf (ChLL)	-	Valiunas et al. (2005)
I-R	Strawberry phylloid fruit (StrawbPhF)	AY102275	Jomantiene et al. (2002a)
16SrII: Peanut WB			
II-A	Peanut witches' broom (PnWB)	L33765	Gundersen et al. (1994)
II-B	' <i>Ca. P. aurantifolia</i> ' (witches' broom of lime, WBDL)	U15442	Zreik et al. (1995)
II-C	Faba bean phyllody (FBP)	X83432	Schneider et al. (1995)
II-D	Sweet potato littleleaf (SPLL)	AJ289193	Gibb et al. (1995)
II-E	Pichris echioides phyllody (PEY)	Y16393	Seemüller et al. (1998a)
II-F	Cotton phyllody (CoP)	EF186827	Khan et al. (2002)
16SrIII: X-disease			
III-A	' <i>Ca. P. pruni</i> ' (Western X-disease, WX)	JQ044393 JQ044392	Davis et al., (2013)
III-B	Clover yellow edge (CYE)	L33766 8	Gundersen et al. (1994)
III-C	Pecan bunch (PB)	EF186807	Martini et al. (2007)
III-D	Goldenrod yellows (GR1)	EF186810	Martini et al. (2007)
III-E	Spiraea stunt (SP1)	AF190228	Lee et al. (1998)
III-F	Milkweed yellows (MW1)	AF510724	Lee et al. (1998)
III-G	Walnut witches' broom (WWB)	AF190226 AF190227	Lee et al. (1998)
III-H	Poinsettia branch-inducing (PoiBI)	AF190223	Lee et al. (1997a)
III-I	Virginia grapevine yellows (VGYIII)	AF060875	Davis et al. (1998)
III-J	Chayote witches' broom (ChWBIII)	AF147706 AF1477067	Montano et al. (2000)
III-K	Strawberry leafy fruit	AF274876	Jomantiene and Davis (2000)
III-L	Cassava frog skin disease	EU346761	Alvarez et al. (2009)
III-P	Dandelion virescence	AF370119 AF370120	Jomantiene and Davis (2001)

III-Q	Black raspberry witches' broom (BRWB7)	AF302841	Davis et al. (2001)
III-T	Sweet and sour cherry (ChD)	FJ231728	Valiunas et al. (2009)
III-U	Cirsium white leaf (CWL)	AF373106 AF373105	Mello et al. (2011)
16SrIV: Coconut lethal yellows			
IV-A	Coconut lethal yellowing (LYJ-C8)	AF498307	Harrison et al. (2002)
IV-B	Yucatan coconut lethal decline (LDY)	U18753	Harrison et al. (1994)
IV-C	Tanzanian coconut lethal decline (LDT)	X80117	Harrison et al. (1994)
16SrV: Elmyellows			
V-A	'Ca. P. ulmi' (elm yellows, EY)	AY197655	Lee et al. (2004b)
V-B	'Ca. P. ziziphi' (Jujube witches' broom, JWB-G1)	AB052876	Jung et al. (2003a)
V-C	Alder yellows (ALY882)	AY197642	Lee et al. (2004b)
V-C	Flavescence dorée (FD-C)	X76560	Daire et al. (1992)
V-D	Flavescence dorée (FD-D)	AJ548787	Martini et al. (1999); Torres et al. (2005)
V-E	'Ca. P. rubi' (Rubus stunt, RuS)	AY197648	Malembic-Maher et al. (2010)
16SrVI: Clover proliferation			
VI-A	'Ca. P. trifolii' (clover proliferation, CP)	AY390261	Hiruki and Wang (2004)
VI-B	Fragaria multicapita	AF036354	Jomantieni et al. (1998a)
VI-C	Illinois ElmYellows (ILEY)	AF268895 AF409069 AF409070	Jacobs et al. (2003)
16SrVII: Ash yellows			
VII-A	'Ca. P. fraxini' (ash yellows, AshY)	AF092209	Griffiths et al. (1999)
VII-B	Erigeron witches' broom	AY034608	Barros et al. (2002)
16SrVIII: Loofah witches' broom			
VIII-A	Loofah witches' broom	AF086621	Ho et al. (2001)
16SrIX: Pigeon pea witches' broom			
IX-A	Pigeon pea witches' broom	AF248957	Lee et al. (1998)
IX-B	'Ca. P. phoenicium' (almond witches' broom, ALWB)	AF515636/AF515637	Verdin et al. (2002)
IX-C	Naxos periwinkle virescence	-	Heinrich et al. (2001)
16SrX: Apple proliferation			
16SrX-A	'Ca. P. mali' (apple proliferation, AP)	AJ542541	Seemuller and Schneider (2004)
16SrX-B	'Ca. P. prunorum' (European stone fruit yellows, ESFY)	AJ542544	Seemuller and Schneider (2004)
16SrX-C	'Ca. P. pyri' (pear decline, PD)	AJ542443	Seemuller and Schneider (2004)
16SrX-D	'Ca. P. spartii' (spartium witches' broom, SpaWB)	X92869	Marcone et al. (2004a)
16SrXI: Rice yellow dwarf			
XI-A	'Ca. P. oryzae' (rice yellow dwarf, RYD)	AB052873	Jung et al. (2003b)
XI-B	Sugarcane white leaf SCWL	X76432	Lee et al. (1997b)
XI-C	Leafhopper-borne BVK	X76429	Seemuller et al. (1994)
16SrXII: Stolbur			
XII-A	'Ca. P. solani' (stolbur) STOL	X76427	Quaglino et al., 2013
XII-B	'Ca. P. australiense' (Australian grapevine yellows, AUSGY)	L76865	Davis et al. (1997)
16SrXIII: Mexican periwinkle virescence			
XIII-A	Mexican periwinkle virescence (MPV)	AF248960	Lee et al. (1998)

XIII-B	Strawberry green petal	U96616	Jomantiene et al. (1998b)
16SrXIV: bermudagrass white leaf			
16SrXIV-A	'Ca. P. cynodontis' (bermudagrass white leaf, BGWL)	AJ550984	Marcone et al. (2004b)
16SrXV: hibiscus witches' broom			
16SrXV-A	'Ca. P. brasiliense' (hibiscus witches' broom, HiWB)	AF147708	Montano et al. (2001)
16SrXVI: sugarcane yellow leaf			
16SrXVI-A	'Ca. P. graminis' (sugarcane yellow leaf, SYL)	AY725228	Arocha et al. (2005)
16SrXVII: papaya bunchy top			
16SrXVII-A	'Ca. P. caricae' (papaya bunchy top, PBT)	AY725234	Arocha et al. (2005)
16SrXVIII: American potato purple top wilt			
16SrXVIII-A	'Ca. P. americanum' (American potato purple top wilt, APPTW)	DQ174122	Lee et al. (2006a)
16SXIX*: chestnut witches' broom			
16SrXIX*	'Ca. P. castaneae' chestnut witches' broom	AB054986	Jung et al. (2002)
16SrXIX: cassia witches' broom			
16SXIX-A	'Ca. P. omanense' (cassia witches' broom, CaWB)	EF666051	Al-Saady et al. (2008)