

INSECTOS PORTADORES DEL FITOPLASMA ASOCIADO A LA ENFERMEDAD CUERO DE SAPO EN EL CULTIVO DE YUCA¹

Yannery Gómez-Bonilla²

RESUMEN

Insectos portadores del fitoplasma asociado a la enfermedad de cuero de sapo en cultivo de yuca. La yuca es un cultivo de gran importancia para el pequeño y mediano productor de trópico húmedo costarricense. El fitoplasma 16SrIII-L se ha asociado con la enfermedad de Cuero de Sapo (CS) está considerada como una de las enfermedades más limitantes para el cultivo de yuca, provocando pérdidas en el rendimiento del cultivo en más de un 90%. El objetivo de esta investigación fue identificar los insectos portadores del fitoplasma en las principales áreas donde se cultiva yuca en el país. Este estudio se enfocó en el muestreo de insectos asociados al cultivo de yuca. Hubo una captura de 725 insectos, en la cual se identificaron 20 géneros de la familia Cicadellidae entre los años 2017-2018. Las especies más abundantes de cada uno de los sitios visitados fueron *Hortensia similis* en un 30% y *Macunola ventralis* con un 22%, *Agallia instabilis*, fue encontrada en un 19%, *Acusoma sp.* y *Sibovia sp.* que no se encontraron en tres sitios, pero se contabilizaron en un 14% y 8% respectivamente, entre la región Huetar Norte y Caribe. Algunas de estas especies dieron positivo como portadoras del fitoplasmas, lo cual pone en evidencia la necesidad de tener un buen manejo de estas especies, ya que podrían llegar a ser posibles vectores de la enfermedad. Las especies positivas a la presencia del fitoplasma fueron *Hortensia similis*, *Macunola ventralis*, *Agallia instabilis*, *Acusama sp.*, *Agrosoma bisperella*, *Tylozygus fasciatus*, *Sterellus bicolor* y *Silovie sp.*, así como algunas de las raíces muestreadas.

Palabras clave: Cuero de sapo en yuca, fitoplasma, Cicadellidae.

Keywords: Cassava frogskin disease, phytoplasma, Cicadellidae.

¹ Proyecto financiado por FITTACORI. Fundación para el Fomento y Promoción de la Investigación y Transferencia de Tecnología Agropecuaria de Costa Rica.

² Yannery Gómez-Bonilla, PH. D. INTA. Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria, INTA. Costa Rica. ygomez@inta.go.cr; yangomez27@yahoo.com. Sede del Laboratorio de Servicios de Fitoprotección del INTA. Sabana Sur, San José.

INTRODUCCIÓN

La yuca constituye un alimento básico en la dieta de 17.8 millones de personas en el mundo (FAOSTAT 2010) además de ser un cultivo industrial con alto potencial, genera ingresos permanentes para pequeños y medianos agricultores y aporta al desarrollo social de las regiones donde se cultiva. El Cuero de Sapo (CS) es considerado como una de las enfermedades más limitantes para el cultivo de yuca, puesto que afecta directamente la producción de raíces, provocando pérdidas en el rendimiento del cultivo del 90% o más (Pineda 1983; Calvert y Cuervo 2002). Estos problemas se presentan debido al poco conocimiento que se tiene sobre la etiología de la enfermedad, por consiguiente, de metodologías eficaces para la detección de los posibles patógenos involucrados y de la selección de materiales libres de la enfermedad en campo o invernadero.

Las raíces de las plantas enfermas son leñosas, de cáscara gruesa, corchosa y quebradiza, las cuales presentan unas hendiduras en forma de labios, que unidas entre sí, semejan una red o panal. Las raíces pueden ser muy delgadas, aunque no siempre, el grosor del tocón y los tallos pueden ser muy gruesos. El aumento del grosor en los tallos está relacionado con la falta de acumulación del almidón en las raíces, los cuales por presentar un diámetro grueso y pueden ser seleccionados erróneamente por el agricultor para reproducir semillas vegetativas. En plantas severamente afectadas (45 a 60 días después de sembradas) se pueden observar lesiones longitudinales características en forma de labio, localizadas en las raíces. Los síntomas de la enfermedad pueden manifestarse en todo el sistema radical, en algunas raíces o sólo en una parte de la raíz afectada, por lo que las lesiones características se encuentran en la base de la raíz, en su parte media, o en su parte apical (Álvarez *et al.* 2010, 2009).

En cuanto al agente causal de esta enfermedad, se le ha asociado a un fitoplasma (16SRIIIL), encontrado en Costa Rica y reportado por (Pardo *et al.* 2015). Los fitoplasmas son bacterias sin pared celular, pleomórficos, con un genoma muy pequeño (680-1600 Kb) y son transmitidos por insectos que causan numerosas enfermedades de importancia económica y ecológica a especies de plantas en todo el mundo (Lee *et al.* 2000; Álvarez, *et al.* 2009). Por lo general los fitoplasmas se ubican en el floema de plantas infectadas y en la hemolinfa de insectos vectores (Contaldo *et al.* 2012). La lista de enfermedades causadas por fitoplasmas (que en un principio fueron atribuidas a virus) han ido en aumento y son consideradas de valor ya que producen enfermedades en muchas especies de importancia económica (Arismendi *et al.* 2010).

Los fitoplasmas son transferido entre plantas por insectos chupadores de savia del floema vectores de diferentes familias incluyendo Psyllidae, Cicadellidae y Cixidae, en los que se reproducen (Lee y Davis, 1992). La familia Cicadellidae, la cual pertenece al orden Hemíptera, suborden Auchenorrhyncha; se divide en dos tribus Cicadellini y Proconiini (Nielson 1979). Muchos de sus miembros se alimentan de áreas de cultivos o plantas asociadas a los mismos (arvenses), son pocos los casos en los que causan problemas directos en las regiones tropicales (Saunders *et al.* 1998).

De acuerdo con Hill (1994), estos insectos tienen tamaños variados que van desde 2 a 3 mm hasta los 14 mm en algunas especies. Una de las principales características de este grupo es que presentan una línea doble de espinas a lo largo del borde exterior de la tibia posterior. Godoy *et al.* (2006) advierte que la alimentación de estos insectos se basa principalmente de la savia de las hojas y tallos de plantas, aunque reconoce que pueden tener múltiples hospederos; agrega que su mecanismo de ingreso a las plantas es por medio del estilete (una modificación de sus partes bucales chupadoras), al hacerlo se pone en funcionamiento un músculo que bombea grandes cantidades de savia de la cual extraen su alimento y energía. Las especies que se alimentan de savia del floema excretan un líquido azucarado y las que se alimentan de la savia de la xilema excretan grandes cantidades de agua (Brodbeck *et al.* 1995; Redak *et al.* 2004).

Se consideran como plaga debido a que pueden actuar como vectores de patógenos (virus, bacterias, protozoarios). Indican (Alma *et al.* 2019), que la epidemiología de las enfermedades asociadas al fitoplasma es una consecuencia de la capacidad de los vectores en la adquisición, inoculación, dispersión, supervivencia, rango del huésped y colonización del hábitat. Dentro de la misma especie vectorial, la eficiencia de adquisición puede depender de la carga de fitoplasma en las plantas de origen y del estadio de vida de los vectores (ninfas *versus* adultos). En esta primera fase de la investigación, se pretende identificar los insectos portadores del fitoplasma, posteriormente, se espera contar con el medio artificial donde se pueda reproducir el fitoplasma, y determinar cuáles de estos insectos son vectores y transmisores de la enfermedad.

El objetivo de esta investigación fue identificar insectos portadores del fitoplasma asociado a la enfermedad conocida como “Cuero de Sapo” en yuca.

MATERIALES Y MÉTODOS

- 1. Identificar los insectos portadores del fitoplasma en los lugares donde se cultiva yuca.**

1.1. Muestreo de insectos y raíces

Durante los años 2017 y 2018, se realizaron muestreos en diferentes fincas, en al menos dos fincas de las principales zonas yuqueras del país: Guatuso (mayo), Sarapiquí (junio), Upala (julio), Pital (setiembre), Venecia (octubre), Cutris (noviembre) todos estos en el año 2017 y Fortuna (marzo), La Tigra (abril), Los Chiles (mayo), Cariari (junio), Santa Clara (julio) en el año 2018. Esta actividad fue continuación del trabajo iniciado en el año 2014 (Álvarez *et al* 2015), en donde se identificaron tres especies de posibles vectores portadores del fitoplasma 16SrIII-L. Los muestreos fueron realizados en horas de la mañana entre las 7am -12 m., el recorrido fue realizado en una ha de terreno alrededor del cultivo de yuca, en donde se caminaba pasando la red cerca de las arvenses en forma de zigzag. En cada una de las fincas se capturaron insectos y se seleccionaron los adultos de la Familia Cicadellidae, se capturaron cientos de ninfas, las cuales no fueron identificadas ni analizadas, se separaron por especie, género o familia y se guardaron en grupo por finca en tubos de reacción de 2 ml para ser preservados en refrigeración a -20 Celsius para su posterior análisis molecular, en el cuadro 1 se muestra los insectos capturados e identificados. Los insectos capturados y que no se pudieron identificar fueron refrigerados y no se les hizo el analices molecular. De cada grupo de insectos se preservó uno (si solo habían dos capturados, si había más se guardan al menos dos insectos) en alcohol de 70% para su posterior identificación taxonómica por medio de claves taxonómicas Knight (2010) y Maes & Godoy (1993).

Los insectos capturados con la red entomológica, fueron colocados en una bolsa plástica y se introdujeron en una hielera a una temperatura de entre 4-8 °C, para que los insectos se mantuvieran quietos y evitar el daño entre ellos. Los sitios de muestreo fueron georeferenciados y visitados una única vez durante todo el periodo del muestreo. En algunas de las fincas fueron tomados muestras de raíces de yuca sin y con síntomas aparentes de la enfermedad, se colocaron en una bolsa plástica dentro de una hielera y posteriormente se mantuvieron a 4 °C hasta su análisis molecular.

2. Análisis moleculares

2.1. Preparación de las muestras

Cada raíz de yuca se lavó con abundante agua de tubo y se cortó en dos o tres pedazos, se partió transversalmente a la mitad y se raspó la parte central de la yuca con la ayuda de un bisturí, el raspado fue depositado en un mortero estéril, se le agregó nitrógeno líquido y se maceró con el pistilo. Para la extracción del ADN y

análisis moleculares, se tomaron dos muestras de 1 ml en un tubo de reacción de 1,5 ml. Los insectos se coloraron todos los que habían de cada especie, por finca, dentro del tubo de reacción de 2 ml, se les agregó nitrógeno líquido y se maceraron con el pistilo. Para la extracción del ADN y análisis de muestras moleculares, igualmente se tomaron dos muestras de 1 ml en un tubo de reacción de 1,5 ml.

2.2. Procedimiento para la Extracción de ADN e identificación de fitoplasma según protocolo de Álvarez *et al.* 2010.

2.2.1. Procedimiento para extracción de ADN

Se preparó el buffer de extracción, mezclando: 0,4 ml de EDTA 0.5 M. 0,4 ml de NaCl 5M y 3,096 ml de H₂O destilada estéril. Este buffer se guardó a 4 °C hasta su uso. A las muestras preparadas, se le adicionó 510 µL de buffer de extracción y 4µL de β-mercapto 14,4 M, el cual debe ser preparado en el momento de la extracción. Se agitó la solución en un vórtex por dos minutos y luego se le adicionó 90 µL de SDS (dodecil sulfato sódico) al 10% y se agitó en vórtex por dos minutos más. Seguidamente, se incubó a 65°C por 10 minutos. Luego se adicionó 150µL de acetato de potasio (pH 5,5) y se invirtió el tubo de reacción hasta homogenizar la muestra y se dejó en hielo por 10 minutos. Pasado ese tiempo, se centrifugó a 14.000 r.p.m por 10 minutos a 4 °C. Se recogió el sobrenadante (+/- 600 µL) y se adicionó 0,5 volúmenes de isopropanol 100% (frío). Se centrifugó a 14.000 rpm por 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se lavó el pellet con 500 µL de etanol 70%. Se centrifugó a 10.000 rpm por cinco minutos. Se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el pellet a temperatura ambiente. Se re suspendió en 100 ul agua o buffer TE y se refrigeró a -20°C hasta su uso.

2.2.2. Análisis por PCR anidado

Se empleó la técnica de PCR anidado, se preparó una mezcla de 12,5 µL de go taq master mix 2X Promega, 0,5 µL de cada cebador, 9,5 µL de agua y 2 µL de cada muestra de medio líquido, para un volumen final de 25 µL.

Para la primera PCR, se utilizaron los cebadores universales P1/Tint (Smart *et al.* 1996), los cuales amplifican un fragmento de 1600 pares de bases, ubicado en la región 16S rDNA y parte del 23S rDNA y para la segunda PCR (PCR 2), los cebadores R16F2n/ R16R2 (Lee *et al.* 1993; Gundersen *et al.* 1996) que generan un amplicón de 1200 pares de bases, correspondiente a la región parcial del 16S.

El perfil de amplificación fue: desnaturalización inicial a 94°C por un minuto y 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por un minuto, alineación 50°C durante dos

minutos y extensión a 72 °C por tres minutos, seguido de una extensión final a la misma temperatura por 10 minutos.

Para la segunda PCR se tomó 1 µL del amplificado y se diluyó en 29 µL de agua. Además, se utilizaron 2 µL de cada cebador R16F2N/ R16R2, ajustando con agua a un volumen final de 25 µL y las mismas condiciones de temperatura de la PCR 1.

La tercera PCR específica para fitoplasmas del grupo III, se realizó tomando un µL del producto amplificado de la segunda PCR y se diluyó en 29 µL de agua. Posteriormente se utilizaron 2 µL de los cebadores R16 (III) F2/R16 (III) R1 (Lee *et al.* 1994), que amplifican un fragmento de 800 pb del gen 16Sr. El perfil de amplificación únicamente cambió en la primera desnaturalización que fue de dos minutos a 94°C.

Como control positivo de los experimentos, se utilizó un tejido infectado de plantas de yuca, proporcionados por el CIAT, se utilizó un solo control negativo (agua para análisis molecular) y dos muestras de cada una de las fincas, tanto con síntomas y sin síntomas de la enfermedad.

2.2.3. Electroforesis

Se usaron 7 µL del producto de amplificación para cargarlos en un gel de agarosa al 1%, teñido con SYBR safe (invitrogen) 4 µL/200cc y se corrieron en electroforesis a 100 V por 140 minutos. Al finalizar la corrida se verificó con transiluminador y se hizo registro fotográfico (Sambrook *et al.* 1989)

2.2.4. Análisis por PCR en tiempo real (qPCR)

Además de los PCR anidados, se utilizó otro método de identificación mediante PCR en tiempo real, siguiendo la metodología descrita por Álvarez y Pardo (2013). La sonda y cebadores están basados en el gen 16Sr dentro de una región de 1400 pares de bases que codifica para proteínas de la subunidad 16S. Esta región es altamente conservada, presenta polimorfismos entre grupos de fitoplasmas y tiene dos copias en el genoma de cada célula bacteriana (Torres *et al.* 2005), logrando mayor sensibilidad.

La sonda se encuentra en la posición 469 y los cebadores en 416 (sentido) y 492 (antisentido), logrando amplificar un fragmento de 72 pares de bases. Se trabajó a una concentración de 200 nM para la sonda y los cebadores. Para las amplificaciones de una región del gen *rp* asociada con el fitoplasma, se utilizaron placa óptica de 96 pozos en un termociclador, con un perfil de amplificación de

estándar Fast Two Step que consiste un ciclo a 95°C por 10 minutos, un ciclo de 95°C por 30 segundos y 40 ciclos 60°C por un minuto. Para la amplificación de ADN del fitoplasma 16SrIII-L se utilizó un volumen de 12 ul por reacción compuesto de 3 ul de ADN, 6.25 ul de SYBR Green Master Mix (Promega), 0.5 ul de Sonda rplII-, 0.75 ul de cebador rplII-PF, 0.75 ul de cebador rplIIPR y 0.75 H₂O molecular. Este análisis fue utilizado solo en los dos primeros lotes, se envió a comprar más, pero el equipo se desconfiguro y no se pudo utilizar más para efectos de este trabajo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Identificar los insectos portadores del fitoplasma en los lugares donde se cultiva yuca.

Hubo una captura de 725 insectos (cuadro 1), de los cuales más 600 fueron de la familia Cicadellidae y fue a esta familia que se le dio prioridad para su identificación. Con la ayuda de las guías taxonómicas, se logró identificar algunos individuos hasta especie, otros insectos se identificaron hasta subfamilia y muchos no se pudieron identificar (Figura 1), se presentan las especies capturadas y los lugares donde fueron capturados. Esta es la familia más grande del Suborden Auchenorrhyncha y sus especies diseminadas en áreas templadas y tropicales del mundo (Knight 2010). Estos insectos también conocidos como chicharritas pertenecen a una de las familias más diversas y se estiman 22000 especies distribuidas en todas las regiones biogeográficas. La importancia fitosanitaria de los cicadélidos radica en la transmisión, dispersión y como reservorios de patógenos como los fitoplasmas, que causan enfermedades en un amplio rango de plantas hospederas (Blanco Rodríguez 2014).

En el cuadro 1, se muestran las especies más abundantes de cada una de los sitios visitados, por ejemplo, *Hortensia similis* y *Macunola ventralis*, fueron las dos especies presentes en todos los lugares muestreados. *H. similis* fue capturado en un 30% de los sitios, Blanco (2014), reporta un 49% de captura en el país. En el caso de *M. ventralis* fue la segunda de mayor captura con un 22%. *Agallia instabilis* se capturó en todos, excepto en Cutris, con una abundancia total del 19%. Luego, en el caso de *Acusoma* sp. y *Sibovia* sp. se encontraron en ocho de los once cantones muestreados, con una abundancia de 14% y 8 % respectivamente.

Cuadro 1: Insectos capturados en las zonas de estudio. Los encontrados como portadores del fitoplasma se marcaron como (+).2016-2017

	Guatuso	Sarapiquí	Upala	Pital	Venecia	Cutris	Fortuna	La Tigra	Los Chiles	Cariari	Santa Clara	% Presente
<i>Hortensia similis</i> (+)	18	4	47	9	9	4	7	19	28	14	25	100
<i>Agallia instabilis</i> (+)	9	3	11	5	4		3	7	8	3	9	90
<i>Macunola ventralis</i> (+)	5	2	4	2	8	7	5	4	9	9	4	100
<i>Tylygus fascilis</i> (+)	7	1	9							5	5	46
<i>Gyponana sp.</i>	3											9
<i>Acusoma sp</i> (+)	4	3		5			7	5	14	5	7	73
<i>Planicephala flaviacosta</i>	4	2										9
<i>Balclutha sp</i>	7	2		2	4	3			6	1		64
<i>Sterellus bicolor</i> (+)	8	4	5							1	5	46
<i>Sibovie sp</i> (+)	5	3		1	5	2		1	9	2	7	73
<i>Agrosoma bisperella</i> (+)	5	2	8					7	12	3	2	64
<i>Typhlocybinae</i>	3	4		6	4	5			13			64
<i>Draeculocephala</i>	5		14									27
<i>Sindelphax fallas</i>	3	4	2	4	6	4						55
<i>Stictolobus sp</i>	2										8	18
<i>Eucelis sp</i>			1									9
<i>Delphacidae</i>			12					3	11			27
<i>Plesiomnata corniculata</i>		4	2									18
<i>Cyrpoptus suavis</i>		6										9
<i>Comocephala dyeri</i>		2				1	1					27
<i>Sranctonus</i>		2			3							18
<i>Trialeurodes variabilis</i>												9
<i>Graminella sp</i>	2	9								4		36
<i>No identificados</i>	15	6	9	4	3	1	5	3	6	4	6	
Total	105	63	124	38	46	27	28	49	116	51	78	725

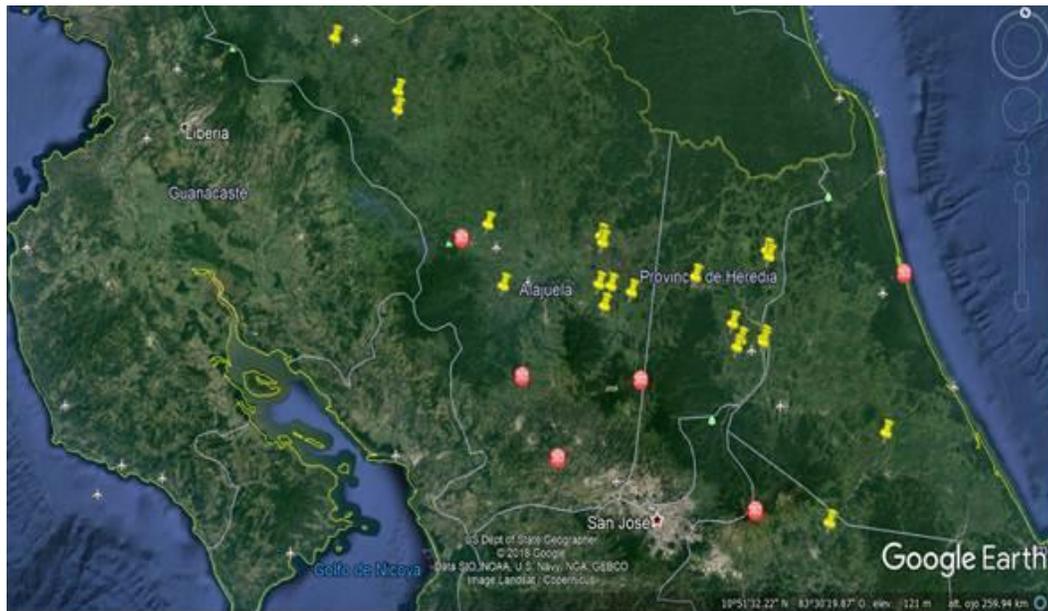


Figura 1: Fincas muestreadas de la región Huetar Norte, los puntos rojos señalan las fincas donde se encontró raíces con la enfermedad de cuero de sapo. Costa Rica. 2018.

Los muestreos fueron realizados una sola vez, por lo que cabe la posibilidad de que si se dieran más muestreos se puedan encontrar la mayoría de estas especies en todos los yucales. De las especies capturadas se encontraron alguna de ellas positivas como portadoras del fitoplasma (+), señaladas en el cuadro 1 y 2. esto pone en evidencia la necesidad de tener un buen manejo de plagas, ya que las mismas se encontraron en las arvenses de todos estos sitios. Aunque la cantidad de fitoplasma que pueden portar estos insectos es poca, a largo plazo podría ser significativa, ya que poco a poco los yucales se van a ir contaminando, (Bianco *et al*/2019) indica que el uso de plantas huésped resistentes al fitoplasma y de material libre de fitoplasma para nuevas plantaciones podría representar un punto de partida para el manejo de la enfermedad del fitoplasma, además de la identificación temprana de plantas huésped infectadas e insectos vectores representa herramientas necesarias para prevenir epidemias de enfermedades. En algunos de los lugares muestreados en esta investigación donde se encontraron insectos positivos, coinciden con los reportados en (Pardo *et al* 2015), donde se indica que Costa Rica, el fitoplasma del grupo 16SrIII-L fueron detectados en las localidades de Aguas Zarcas, Pital, Los Lagos, La Merced, Los Chiles, Alajuela, Fortuna y Guápiles y que los síntomas de la enfermedad encontrado en las raíces mostraron una mayor gravedad de la enfermedad.

2. Análisis moleculares

Se analizaron muestras agrupadas en 12 lotes, los insectos colectados fueron identificados por especie, género o familia (Cuadro 1 y 2). En la mayoría de las fincas se observaron plantas con la enfermedad de cuero de sapo en diferentes grados de severidad y como se observa en este cuadro tres sitios fue donde se encontró mayor cantidad de insectos positivos, como fueron Guatuso, los Chiles y Venecia. En el caso de la especie *H. similis* y *M. ventralis*, se encontró en el 100% de los sitios muestreados, en Guatuso y Venecia dieron positivo, como portadoras del fitoplasma, es un dato importante, porque la enfermedad se puede seguir diseminando por medio de los insectos..

Cuadro 2: Insectos analizados con la técnica de qPCR y PCR, en los diferentes lugares donde se realizó el muestreo.

Sitios	Severidad	No. Insecto/raíz	Q PCR	PCR
Upala	+/2	8 raíces	8/+	2/+
Guatuso	+/4	8 raíces	8/+	8/+

		<i>H. similis</i>	+	+
		<i>T. fasciatus</i>	+	+
		<i>Sterellus bicolor</i>	+	+
		<i>Acusoma sp.</i>	+	+
Guatuso	+/4	8 raíces	8/+	3/+
		<i>H. similis</i>	+	+
		<i>Acusoma sp.</i>	+	+
		<i>M. ventralis</i>	+	+
		<i>Sibovie sp</i>	+	+
		<i>Agrosoma bisperella</i>	+	+
		<i>T. fasciatus</i>	+	+
		Typhlocybinæ	+	+
Guatuso	+/4	8/raíces	8/+	3/+
		<i>H. similis</i>	+	+
		<i>Agallia instabilis</i>	+	+
		<i>M. ventralis</i>	+	+
		<i>T. fasciatus</i>	+	+
		<i>Acusoma sp.</i>	+	-
		<i>Gyponana</i>	+	-
		<i>Acusoma sp.</i>	+	+
		<i>Planicephala flaviacosta</i>	+	-
		<i>Balclutha sp</i>	+	+
		<i>Sterellus bicolor</i>	+	+
Los chiles	+/4	8/raíces	NO	5/+
La tigrá	+/0 y 4	8/raíces	NO	1/+
La tigrá	2	8/raíces	NO	8/-
Los chiles	+/4	8/raíces	NO	8/-
La Fortuna	2	8/raíces	NO	8/-
		<i>Comocephala dyeri</i>	NO	-
Guatuso	+/4	<i>Agallia instabilis</i>	NO	+
		<i>Graminella sp.</i>	NO	-
		<i>Balclutha sp</i>	NO	+
		<i>Draeculocephala</i>	NO	-
		<i>Stictolobus sp</i>	NO	-
		<i>M. ventralis</i>	NO	-
		<i>Acusoma sp.</i>	NO	-
		<i>Sibovie sp</i>	NO	-
Upala	+/2	<i>Plesiornata corniculata</i>	NO	-
		<i>H. similis</i>	NO	-
		<i>Acusoma sp.</i>	NO	-
		<i>Stictolobus sp</i>	NO	-
		<i>M. ventralis</i>	NO	-
		<i>T. fasciatus</i>	NO	-
		<i>Draeculocephala</i>	NO	-
		<i>Eucelis sp</i>	NO	-
		<i>Sindelphax fallas</i>	NO	-
		<i>Delphacidae</i>	NO	-

Venecia	+ / 4 y 5	8/raíces	NO	-
Pital	-	8/raíces	NO	-
Venecia	-	8/raíces	NO	-
Venecia	+ /4 y 5	8 /raíces	NO	-
Venecia	+/4	8/raíces	NO	-
Pital	+/3	8/raíces	No	-
Sarapiquí	-	8/raíces	NO	-
		<i>Agallia instabilis</i>	NO	-
		<i>Acusoma sp.</i>	NO	-
Venecia	-	<i>Plesiomnata corniculata</i>	NO	-
		<i>Balclutha sp</i>	NO	-
		<i>M. ventralis</i>	NO	-
		Typhlocybinae	NO	-
		<i>Balclutha sp</i>	NO	-
		<i>Agrosoma bisperella</i>	NO	-
		<i>H. similis</i>	NO	-
		<i>M. ventralis</i>	NO	-
		<i>Sibovie sp</i>	NO	-
		<i>Sindelphax fallas</i>	NO	-
		<i>Cyproptus suavis</i>	NO	-
		<i>Comocephala dyeri</i>	NO	-
		Pentatomidae	NO	-
		<i>Acusoma sp.</i>	NO	-
Sarapiquí	-	8/raíces	NO	-
Venecia	+/4	<i>H. similis</i>	NO	-
		<i>Agrosoma bisperella</i>	NO	-
		<i>Sranctonus</i>	NO	-
		Pentatomidae	NO	-
		<i>M. ventralis</i>	NO	-
		<i>Agallia instabilis</i>	NO	-
		<i>Balclutha sp</i>	NO	-
		Typhlocybinae	NO	-
		<i>Sibovie sp</i>	NO	-
		Pentatomidae	NO	-
		Venecia	+ / 4 y 5	<i>H. similis</i>
<i>M. ventralis</i>	NO			+
<i>Sindelphax fallas</i>	NO			+
<i>Comocephala dyeri</i>	NO			+
<i>Balclutha sp</i>	NO			+
<i>Graminella sp</i>	NO			+
Typhlocybinae	NO			+
<i>Sibovie sp</i>	NO			+
La Fortuna	+/2	<i>Draeculocephala</i>	NO	-
		<i>Acusoma sp.</i>	NO	-
		<i>M. ventralis</i>	NO	-
		<i>H. similis</i>	NO	-
		Pentatomidae	NO	-

		<i>Agallia instabilis</i>	NO	-
		<i>Comocephala dyeri</i>	NO	-
Los chiles	+/4	Pentatomidae	NO	-
		Typhlocybae	NO	-
		Typhlocybae	NO	-
La tigre	+/2	<i>Acusoma sp.</i>	NO	-
		<i>Agallia instabilis</i>	NO	-
		Pentatomidae	NO	-
		<i>M. ventralis</i>	NO	-
		<i>H. similis</i>	NO	-
		<i>Graminella sp</i>	-	-
Los chiles	+/4	Pentatomidae	NO	-
		<i>M. ventralis</i>	NO	-
La tigre	+/0 y 4	<i>M. ventralis</i>	NO	-
		<i>Sibovie sp</i>	NO	-
		Pentatomidae	NO	-
		<i>Acusoma sp.</i>	NO	-
		<i>Delphacidae</i>	NO	-
		<i>Agallia instabilis</i>	NO	-
		<i>H. similis</i>	NO	-
		<i>Agrosoma bisperella</i>	NO	-
Santa Clara	+/4	<i>T. fasciatus</i>	NO	-
		<i>Agrosoma bisperella</i>	NO	-
		<i>Stictolobus sp</i>	NO	-
Sarapiquí	+/1	4/raíces	NO	-
Sarapiquí	+/8	8/raíces	NO	-
Sarapiquí	+/1	4/raíces	NO	-
		<i>Planicephala flaviacosta</i>	NO	-
Venecia	+ /4 y5	Typhlocybae	NO	-
		<i>H. similis</i>	NO	-
		<i>Sindelphax fallas</i>	NO	-
Venecia	+/ 4 y 5	<i>Balclutha sp</i>	NO	-
		Typhlocybae	NO	-
		<i>H. similis</i>	NO	-
		Pentatomidae	NO	-
		<i>Agallia instabilis</i>	NO	-
Pital	+/3	<i>Sindelphax fallas</i>	NO	-
		<i>M. ventralis</i>	NO	-
		Pentatomidae	NO	-
		Typhlocybae	NO	-
		<i>Balclutha sp</i>	NO	-
		<i>Agallia instabilis</i>	NO	-
		<i>Sibovie sp</i>	NO	-
		<i>Acusoma</i>	NO	-
		<i>H. similis</i>	NO	-
Guápiles	-	12/plantas In vitro	NO	-

Los chiles	+/4	4/raíces	NO	-
Los chiles	+/4	4/raíces	NO	-
Guatuso	+/2 y 4	8/raíces	NO	-
San Carlos	+/4	8/raíces	NO	-
Guatuso	+/2	8/raíces	NO	-
San Carlos	+/4	8/raíces	NO	-
San Carlos	+/4	8/raíces	NO	-
	+/4	8/raíces	NO	-
	+/4	8/raíces	NO	-
	+/4	8/raíces	NO	-
	+/4	8/raíces	NO	-
Cutris		<i>Comocephala dyeri</i>	NO	-
		<i>H. similis</i>	NO	-
		<i>Balclutha sp</i>	NO	-
		<i>M. ventralis</i>	NO	-
		<i>Sibovie sp</i>	NO	-
		Typhlocybae	NO	-
		<i>Sindelphax fallas</i>	NO	-
Sarapiquí	+/4	<i>Agallia instabilis</i>	NO	-
		<i>Acusoma sp.</i>	NO	-
		<i>Sranctonus</i>	NO	-
		<i>T. fasciatus</i>	NO	-
		<i>Graminella</i>	NO	-
		<i>Sibovie sp</i>	NO	-
		<i>Balclutha sp</i>	NO	-
		<i>M. ventralis</i>	NO	-
		<i>Plesiomnata corniculata</i>	NO	-
		Pentatomidae	NO	-
		<i>Comocephala dyeri</i>	NO	-
		<i>H. similis</i>	NO	-
		Sarapiquí	+/2	<i>T. fasciatus</i>
<i>Graminella</i>	NO			-
Pentatomidae	NO			-
Typhlocybae	NO			-
<i>H. similis</i>	NO			-
Sarapiquí	+/1	<i>Plesiomnata corniculata</i>	NO	-
		<i>Acusoma sp.</i>	NO	-
		<i>Agrosoma bisperella</i>	NO	-
		<i>Sibovie sp</i>	NO	-
		<i>Sterellus bicolor</i>	NO	-
		<i>Acusoma sp.</i>	NO	-
		<i>H. similis</i>	NO	-
		Typhlocybae	NO	-
		<i>M. ventralis</i>	NO	-
		<i>Agrosoma bisperella</i>	NO	-
		Sarapiquí	+/1	<i>Acusoma sp.</i>
<i>H. similis</i>	NO			-

		<i>Sibovie sp</i>	NO	-
		<i>M. ventralis</i>	NO	-
Los chiles	5	VALENCIA 12 MUESTRAS	NO	+
		SEÑORITA 14 MUESTRAS	NO	+
		<i>Delphacidae</i>	NO	-

El análisis de PCR en tiempo real, según lo indicado por Álvarez *et al.* (2010), al ser más sensible, puede amplificar hasta 1000 veces más que el PCR convencional, de ahí que la reacción se encuentra en un rango exponencial y puede alcanzar un umbral definido. Se hace la observación que solo en los dos primeros lotes hubo análisis con la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) y es donde se dieron mayor cantidad de positivos y por ende mayor cantidad de especies de cicadellidos portadores del fitoplasma (Cuadro 2), mientras que algunas otras especies fueron negativas. Para estas muestras el umbral fue de Ct 24-35, considerados como positivos, o sea que el fitoplasma está presente, fue el caso de *Hortensia similis*, *Tylozygus fasciatus*, *Macunola ventralis*, *Acrosoma bispinella*, *Silovia sp.*, *Sterellus bicolor*, *Acusama sp.*, *Agallia instalis* (Figura 2). Las tres primeras especies (*H. similis*, *T. fasciatus* y *M. ventralis*) coinciden con el informe donde se reportan como positivos y posibles vectores del fitoplasma 16SrIII-L analizados en el CIAT (Álvarez, *et al.* 2015).

Se continuaron los análisis con el PCR anidado, realizando tres etapas del PCR, para determinar la presencia del fitoplasma. La cantidad de fitoplasma en cada uno de los insectos es poca, y por cada PCR se va aumentando la cantidad de fitoplasma presente. Los resultados de los análisis dieron positivo para las especies portadoras del fitoplasma para *Macunolla ventralis*, *Hortensia similis*, *Acusana sp.*, *Sibovia sp.*, *Agallia sp.*, *Tylozygus fasciatus*, *Agrosoma bispinella*, *Sterellus bicolor* (Figuras 3 y 4). De las raíces analizadas, se incluyeron en diferentes grados de severidad, y aunque a la vista con síntomas característicos de la enfermedad en con el PCR anidado no dieron positivos. Lamentablemente no se pudo avanzar en esta investigación para poder demostrar que estos insectos son vectores, ya que (Contaldo *et al* 2016 y Betancourth *et al* 2019), lograron por primera vez, en el mundo, que se consolidara la información suficiente, donde los aislamientos del fitoplasmas se pueden reproducir en un medio artificial. Al tener este gran logro posteriormente se pueden realizar las investigaciones para poder probar que estos insectos pueden llegar a ser vectores.

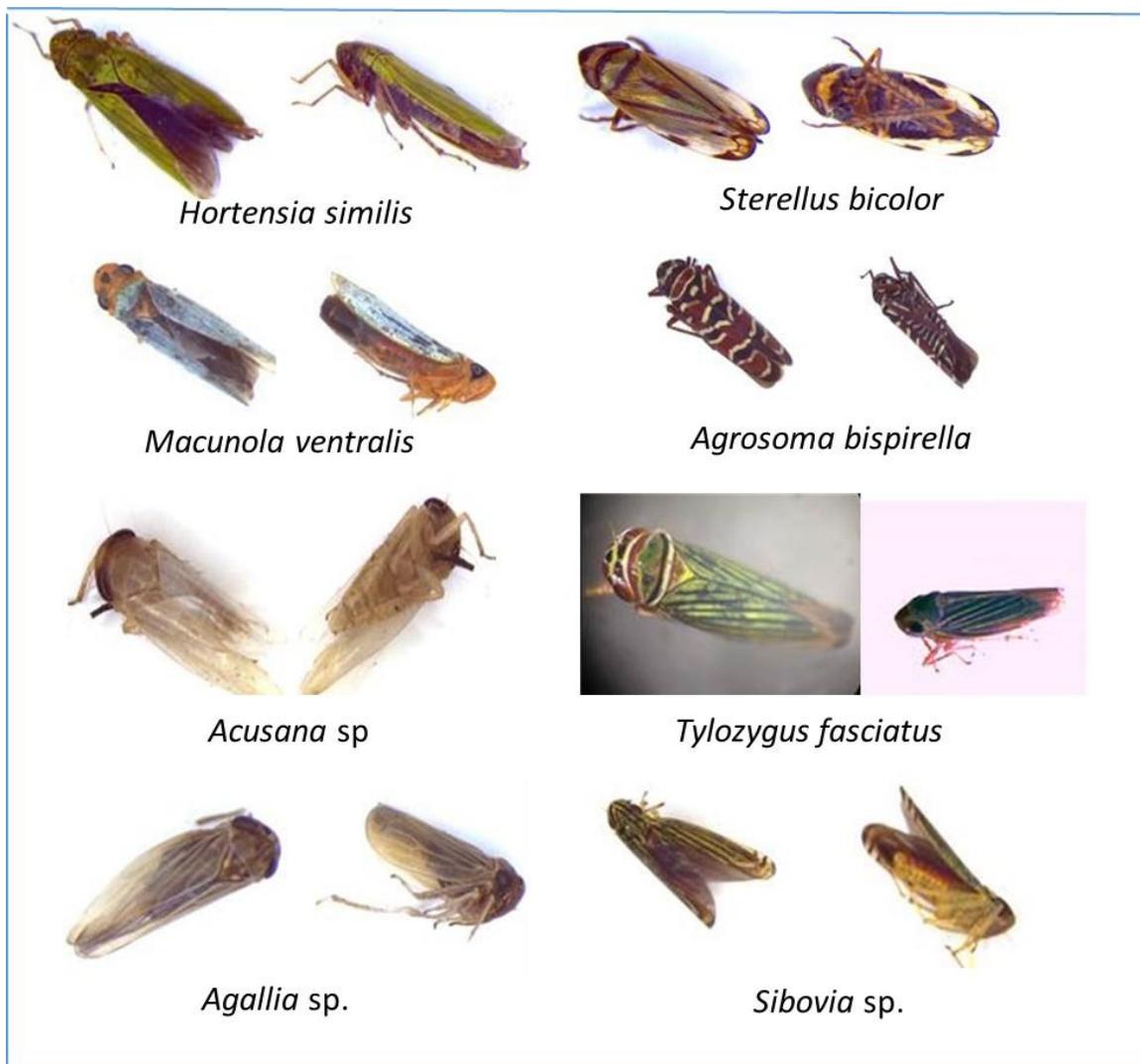


Figura 2: Especies de Cicadellidae que fueron positivos como portadores del fitoplasma que produce la enfermedad de cuero de sapo. Costa Rica. 2017-2018.

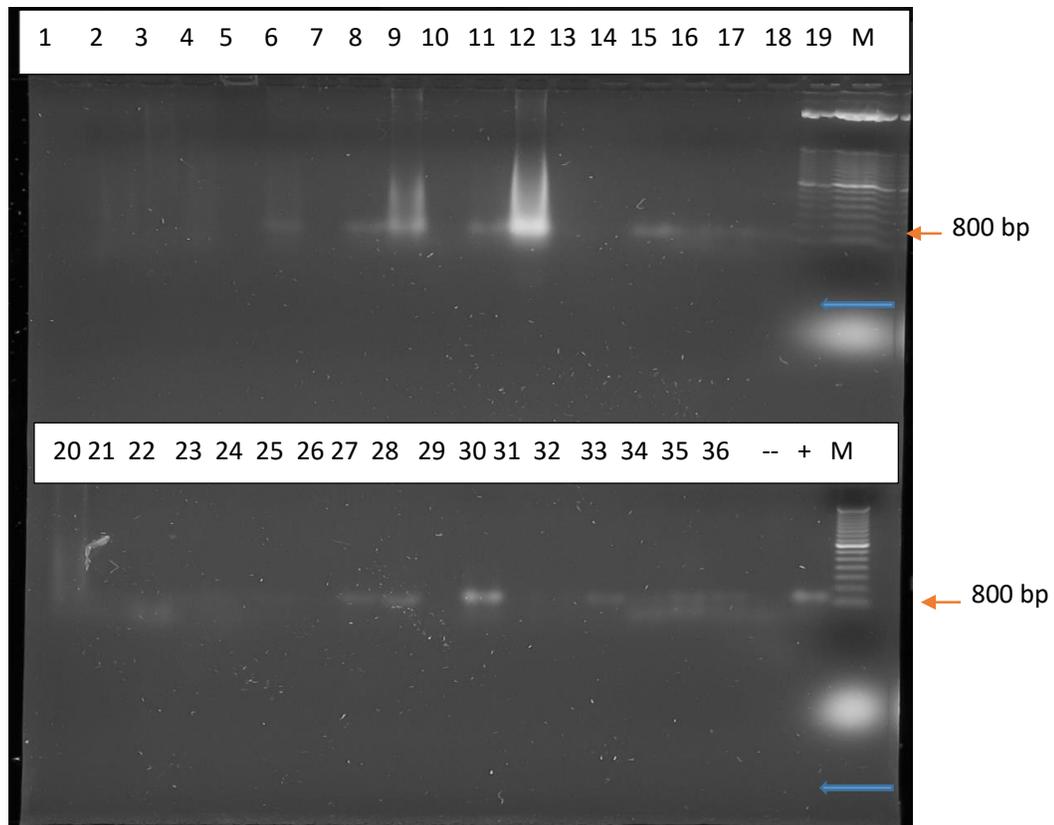


Figura 3: Electroforesis del PCR 3, mostrando los positivos de las especies de insectos portadoras. Las muestras del 1-19 corresponden a raíces de diferentes fincas con diferentes grados de severidad de 2-4, las muestras 20 y 21 corresponden a *Macunola ventralis*, 22 y 23 a *Hortensia similis*, 26 y 27 a *Acusana* sp., 28 y 29 a *Sibovia* sp., 30 y 31 a *Agallia* sp., 32 y 33 a *Tylozygus fasciatus*, 34 y 35 a *Agrosoma bispinella*, (+ es el positivo), (- negativos). M: marcador de peso molecular, (Hyper ladder II (bioline) 100 lanes).

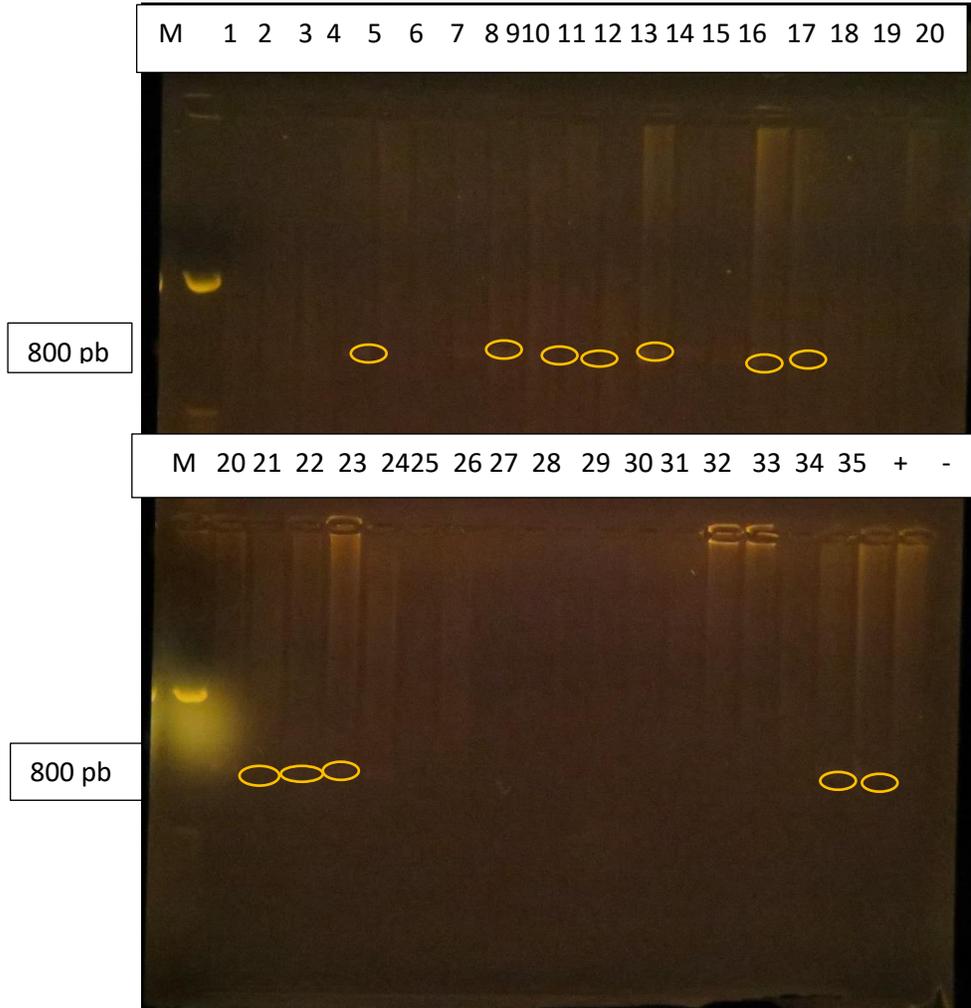


Figura 4: Dos salidas de electroforesis de diferentes muestras, con salida del PCR3, donde algunas dieron positivo, algunas muestras corresponden a insectos que fueron positivos 5- *Macunola ventralis*, 8- *Acusana* sp, 10- *Agallia* sp, 12-13 Hortensia similis, 16 -17 *Agrosoma bispinella*, 23- *Tylozygus fasciatus*, + es el positivo. M: marcador de peso molecular, (Hyper ladder II (bioline) 100 lanes.

Los fitoplasmas son transmitidos por insectos del Orden Hemíptera y las familias Cicadellidae, Cixidae, Cercopidae, Psillidae y Fulgoridae. Estos se multiplican en el interior del insecto y persisten hasta su muerte. Aunque no se transmiten a la descendencia, se ha podido demostrar la transmisión vertical de los fitoplasmas que transmiten la flavescencia dorada (Flavescence dorée, FD) y la hoja blanca de la caña (Sugarcane white leaf) SWL en los vectores *Scaphoideus titanus* Ball (Gaur et

al. 2008) y *Matsumuratettix hiroglyphicus*, Matsumura (Gomes *et al.* 2004). Los insectos que llegan hasta el floema de la planta, principalmente los saltahojas como el saltahoja de la papa (*Empoasca fabae*) y el saltahoja del Aster (*Macrostelus quadrilineatus*), transmiten los fitoplasmas de planta a planta (Davis *et al.* 2015) También han sido identificadas ciertas especies de la familia Pyllidae como vectores transmisores de enfermedades causadas por fitoplasmas como el amarillamiento de frutas de hueso Stone fruit yellows (Arocha and Jones 2008) y la proliferación de la manzana (Apple proliferation) (Bernamini *et al.* 2002a). Se caracterizaron a nivel molecular fitoplasmas en zanahoria, repollo y cebolla identificando al 16SrII-D y resultaron positivos también los insectos *Empoasca spp.* *O. albicinctus*, *A. bigutula Nervosa spp.* (Sharif *et al.* 2019). En la investigación de (Zambon *et al.* 2019), lograron identificar tres especies de fitoplasmas en el cultivo de la vid portados en dos especies de insectos .

Una de las especies capturadas, pero no fue positiva en nuestro caso, es de suma importancia en el seguimiento en las zonas yuqueras es *Scaphytopius* sp. (Figura 5). Esta fue identificada como el agente causal del “Cuero de sapo”, en Colombia (Álvarez *et al.* 2010).



Figura 5: Género *Scaphytopius* sp. se encontró en la Región Huetar Norte. Costa Rica. 2019.

Es posible que la diseminación inicial de la enfermedad de “Cuero de sapo” a la Región Caribe se debió al traslado de semilla contaminada de la Región Huetar Norte, la cual fue reportada desde 1997. Por lo tanto, se recomienda a los productores no cosechar ni acarrear semilla de esta región, por el contrario, se les insta a producir su propio material y preferiblemente en sus propias fincas.

La baja proporción de insectos portadores encontrada (menor al 1%) concuerda con lo registrado en numerosos estudios a campo de fitoplasmas. Por ejemplo, sólo del 1-40% de los individuos de *Cacopsylla pyricola* (Foerster) eran portadores del fitoplasma del “declinamiento del peral” (Musetti *et al.* 2005), el porcentaje de

Macrosteles quadrilineatus (Forbes) portadores del fitoplasma del “amarillamiento del aster” fue de 3 a 5% (Prince *et al.* 1993) y Perilla (2013) hallaron solamente el 3% de los especímenes de *Dalbulus maidis* portadores del fitoplasma causal de Maize bushy Stunt. Por lo tanto, debido a la baja cantidad de individuos recolectados de las restantes especies, no puede descartarse que estas puedan ser vectores del fitoplasma causal del “cuero de sapo”.

Referencias Bibliográficas:

Alma, A; Lessio, F; Nickel, H. 2019. Chapter 1 Insects as Phytoplasma Vectors: Ecological and Epidemiological Aspects. Book: Pathogenic Bacteria - II, A. Bertaccini *et al.* (eds.), https://doi.org/10.1007/978-981-13-2832-9_11

Álvarez, E; Gómez-Bonilla, Y. Zacher, M; Campo, R. 2015. INFORME TECNICO: Innovaciones tecnológicas en el manejo integrado del Cuero de Sapo de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz): Estrategias para reducir el impacto de la enfermedad por efectos del cambio climático en Colombia, Costa Rica y Paraguay FTG-100382010 Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). <http://www.fontagro.org/new/uploads/adjuntos/Informe-Final-Fontagro-31-Julio.pdf>

Álvarez, E; Pardo, J. 2013. Diseño de sonda TaqMan® y cebadores específicos para la detección de fitoplasmas asociados a la marchitez letal en Palma de Aceite (*Elaeis guineensis*). Cali, Colombia. Informe Técnico, archivo Patología de Yuca. CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 85 p.

Álvarez, E; Mejía, JF; Pardo, JM. 2010. Development of a Real-time PCR assay, to detect and quantify a 16SrIII-L Phytoplasma associated with cassava frogskin disease (CFSD). *Phytopathology* 100(6):100-105.

Álvarez, E; Mejía, JF; Llano, G; Loke, J; Calari, A; Duduk, B; Bertaccini, A. 2009. Detection and molecular characterization of Phytoplasma associated with frogskin disease in cassava. *Plant Disease* 93:1139-1145.

Álvarez, E, Mejía, JF, Llano, GA, Loke, JB, Calari, A, Duduk, B, Bertaccini, A. 2009. Characterization of a phytoplasma associated with frogskin disease in cassava. *Plant Dis.* 93:1139-1145

Arocha, Y; Jones, P. 2008. Phytoplasmas affecting sugarcane and papaya in Cuba. *In* Harrison, N; Rao, GP. and Marcone, C. (eds) *Characterization, diagnosis and management of phytoplasmas*. Studium Press LLC. Texas. p. 249–273.

Arismendi, N; Carrillo, R; Andrade, N. 2010. Molicutes fitopatógenos transmitidos por insectos: Interacciones y efecto en sus vectores. *Agro Sur*. 38(2):55-67.

Bertamini, M; Grando, M; Muthuchelian, K; Nedunchezian, N. 2002a. Effect of phytoplasmal infection on photosystem II efficiency and thylakoid Membrane protein changes in field grown apple (*Malus pumila*) leaves. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 61:349–356.

Betancourth, C; Pardo, JM; Muñoz; Álvarez, E. 2019. Isolation of phytoplasmas associated to frogskin disease in cassava. *Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient.* 22(1):1177. <https://doi.org/10.31910/rudca.v22.n1.2019.1177>.

Bianco, PA; Romanazzi, G; Mori, N; Myrie, M; Bertaccini, A. 2019. Chapter 11 Integrated Management of Phytoplasma Diseases. Book: *Pathogenic Bacteria - II*, A. Bertaccini et al. (eds.). 237-258. https://doi.org/10.1007/978-981-13-2832-9_11

Blanco Rodríguez, E. 2014. Cicadélidos (Hemiptera: Cidallellidae) asociados a cítricos en la Península de Yucatán. Tesis de Maestro en Ciencias del Colegio de postgraduados del Instituto de enseñanza e investigación en Ciencias Agrícolas, Montecillo, Texcoco, México. 76 p.

Brodbeck, BV; Andersen, PC; Mizell III, RF. 1995. Differential utilization of nutrients during development by xylophagous leafhopper, *Homalodisca coagulata*. *Entomologia experimentalis et applicata* 75:279-289.

Calvert, L; Cuervo, M. 2002. Cuero de Sapo: yuca en el tercer milenio. *Sistemas modernos de producción, procesamiento, utilización y comercialización*. Ospina, B; Caballos, H (eds). p. 264-268.

Contaldo, N; Satta, E; Zambon, Y; Paltrinieri, S; Bertaccini, A. 2016. Development and evaluation of different complex media for phytoplasma isolation and growth. *J. Microbiological Methods*. 127:105-110. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.05.031>

Contaldo, N; Bertaccini, A; Paltrinieri, S; Windsor, H; Windsor, D. 2012. Axenic Culture of plant pathogenic phytoplasmas. *Phytopathologia Mediterranea*. 51(3):607-617.

Davis, R; Dally, E; Zhao, Y; Lee, I; Wei, W; Wolf, T; Beanland, L; LeDoux, D; Johnson, D; Fiola, J; Peterson, H; Dami, I; Chien, M. 2015. Unraveling The Etiology of North American Grapevine Yellows (NAGY): Novel NAGY Phytoplasma

Sequevars Related to 'Candidatus Phytoplasma pruni'. *Plant Disease* 99(8):1087-1097.

Gaur, RK, Raizada, R; Rao, GP. 2008. Sugarcane yellow leaf phytoplasma associated for the first time with sugarcane yellow leaf syndrome in India. *Plant Pathology* 57:772.

Gibb, K; Padovan, A; Mogen, B. 1995. Studies on sweet potato little-leaf phytoplasmas detected in sweet potato and other plant species growing in Northern Australia. *Phytopathology* 85:169-174.

Gomes, A; Jardim, S; Teixeira-Guimaraes, C; de Souza, E; Oliveira, E. 2004. Genetic variability of Brazilian phytoplasma and spiroplasma isolated from maize plants. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 39:61–65.

Godoy, C; Garita-Cambronero, J; Rivera, C. 2006. New species of *Kapateira* Young from Costa Rica. *Zootaxa* 1282:29-38.

Gundersen, D; Lee, I; Schaff, D; Harrison, N; Chang, C; Davis, R; Kingsbury, D. 1996. Genomic diversity and differentiation among phytoplasma strains in 16s rRNA groups I (aster yellows) and III (X-disease). *International Journal Systematic Bacteriology* 46: 64-75.

Hill, D. 1994. *Agricultural entomology*. Oregon, US. Timber Press. 635 p.

Knight, WJ. 2010. *Leafhoppers (Cicadellidae) of the Pacific. An annotated systematic checklist of the leafhoppers recorded in the Pacific region during the period 1758 – 2000 (en línea)*. London, UK. 332 p. Consultado 14 de julio 2020. Disponible en <http://www.tymbal.org/publicat/KnightCatalogue.pdf>.

Maes, JM; Godoy, C. 1993. Catálogo de los Cicadellidae (Homóptera) de Nicaragua. *Rev. Nica. Ent.* 24:5-34.

Musetti, R; Sanità Di Toppi, L; Martini, M; Ferrini, F; Loschi, A; Favali, M; Osler, R. 2005. Hydrogen peroxide localization and antioxidant status in the recovery of apricot plants from European Stone Fruit Yellows. *European Journal of Plant Pathology* 112:53–61.

Nielson, MW. 1979. Taxonomic relationships of leafhopper vector of plant pathogens. *In* *Leafhopper vector and plant disease agents*. Maramorosch, K; Harris, KF (eds). Londres, GB. Academic press. p. 3-27.

Lee, I; Hammond, R; Gundersen, D. 1993. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology* 83:834-842.

Pardo, JM; Truke, MJ; Cardozo, L; Varela, I; Álvarez, E. 2015. A real-time PCR assay to detect and quantify 16SrIII-L and 16SrI phytoplasmas associated with cassava frogskin disease in Costa Rica and Paraguay. *Phytopathology*. 105 (3): 1p. Supplement: 1

Perilla, L. 2013. Determinación de la capacidad de transmisión de fitoplasmas en Dos morfoespecies de la familia Cicadellidae (Hemiptera: Auchenorrhyncha). Tesis Mag. Sc. Bogotá, Colombia. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Departamento de Química. 137 p.

Pineda, B; Jayasinghe, U; Lozano, JC. 1983. La enfermedad “Cuero de Sapo” en yuca (*Manihot esculenta* Crantz). *ASIAVA* 4:10-12.

Prince, J; Davis, R; Wolf, T; Lee, I; Mogen, B; Dally, E; Bertaccini, A; Credi, R; Barba, M. 1993. Molecular detection of diverse mycoplasma like organisms (MLOs) associated with grapevine yellows and their classification with aster yellows, X - disease, and elm yellows MLOs. *Phytopathology* 83:1130-1137.

Redak RA; Purcell AH; Lopes JSR; Blua MJ; Mizell III RF; Andersen PC. 2004. The biology of xylem fluid-feeding insect vectors of *Xylella fastidiosa* and their relation to disease epidemiology. *Annual Review of Entomology* 49:243–70.

Sambrook, J; Fritsch, E; Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York. 215 p.

Saunders, JL; Coto, D; King, AB. 1998. *Las plagas invertebradas de cultivos anuales alimenticios en América Central*. San José, Costa Rica, CATIE. 305 p.

Sharif, NZ; Ahmad, SJ; Tahir, M; Ziaf, K; Zhang, SH; Ahmad, JM. 2019. Molecular Identification and Characterization of Phytoplasmas associated with Carrot, Cabbage and Onion crops and their insect vectors in Punjab, Pakistan. *Pak. J. Agri. Sci.*, 56(2):407-414. DOI:10.21162/PAKJAS/19.7152.

Smart, C; Schneider, B; Blomquist, C; Guerra, L; Harrison, N; Ahrens, U; Lorenz, K; Seemuller, E; Kirkpatrick, B. 1996. Phytoplasma-specific PCR primers based on

sequences of the 16S-23S rRNA spacer region. *Applied Environment Microbiology*, 62:2988-2993.

Torres, E; Bertolini, B; Cambra, M; Montón, C; Martín, M. 2005. Real-time PCR for simultaneous and quantitative detection of quarantine phytoplasmas from apple proliferation (16SrX) group. *Molecular and Cellular Probes* 19:334–340.

Zambon, Y; Canel, A; Bertaccini, A; Contaldo, N. 2018. Molecular Diversity of Phytoplasmas Associated with Grapevine Yellowing Disease in Northe-Eastern Italy. *Phytopathology*. 108:206-214. [https:// doi.org/10.1094/PHYTO-07-0253-R](https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-0253-R)