

DIFFUSIONE DEL FITOPLASMA DEL GIALLUME EUROPEO DELLE DRUPACEE (ESFYP) IN IMPIANTI PESCHICOLI NELLA VALLE DEL SARCA (TN)

C. POGGI POLLINI⁽¹⁾, P. MIORELLI⁽²⁾, R. BISSANI⁽¹⁾, F. TERLIZZI⁽¹⁾, C. AGNOLIN⁽²⁾

⁽¹⁾ DiSTA, Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali - Patologia Vegetale
Università degli Studi - Via F. Re 8, 40126 Bologna

⁽²⁾ ESAT, Ente Sviluppo Agricolo Trentino - Sarche (TN)

RIASSUNTO

Rilievi di campo effettuati nel biennio 2000-2001 nelle aziende a vocazione peschicola situate nella bassa valle del Sarca (TN) hanno permesso di osservare piante di diverse cultivar con sintomi riferibili al fitoplasma del giallume europeo delle drupacee (ESFYP= European Stone Fruit Yellow Phytoplasma). Nei frutteti visitati le piante interessate dall'alterazione presentavano un'incidenza bassa (< 1%); nella maggior parte dei casi le piante erano innestate su "GF 677". Nella maggioranza dei campioni sintomatici è stato individuato esclusivamente ESFYP, utilizzando diversi metodi di diagnosi: PCR con iniziatori ribosomiali, non-ribosomiali e PCR-ELISA. E' la prima volta che viene effettuata un'indagine conoscitiva per valutare la presenza e la diffusione di questa fitoplasmosi, già segnalata nel comprensorio frutticolo del basso Sarca su albicocco e susino europeo, nei pescheti.

Parole chiave: giallume europeo delle drupacee, pesco, diagnosi molecolare, PCR-ELISA.

SUMMARY

SPREAD OF EUROPEAN STONE FRUIT YELLOW PHYTOPLASMA (ESFYP) IN PEACH ORCHARDS IN THE SARCA VALLEY (TN)

Field surveys were carried out during 2000-2001 in peach orchards in the lower Sarca valley (Trento) to detect trees of different cultivars with symptoms of European Stone Fruit Yellow Phytoplasma (ESFYP). There was a low incidence of symptoms (< 1%) in the orchards inspected. The majority of the plants affected were grafted on rootstock GF 677. In the majority of symptomatic samples only ESFYP was detected using various diagnostic methods: PCR with ribosomal and non-ribosomal primers and PCR-ELISA. This is the first survey to assess the presence and diffusion of this syndrome, already reported in the fruit-growing area of the lower Sarca valley on apricots and European plums, in peach trees.

Key words: European Stone Fruit Yellow Phytoplasma, peach trees, molecular detection, PCR-ELISA.

INTRODUZIONE

In Italia e nel resto d'Europa sono presenti varie sindromi che colpiscono tutte le principali drupacee coltivate, tranne il ciliegio, collettivamente indicate con il termine di "giallume europeo delle drupacee"; indotte da un fitoplasma (fitoplasma del giallume europeo delle drupacee, European Stone Fruit Yellow Phytoplasma = ESFYP) che, dal punto di vista genetico, è fortemente correlato con gli agenti della moria del pero (Pear Decline = PD) e degli scopazzi del melo (Apple Proliferation = AP) (Lee *et al.*, 1998; Seemuller *et al.*, 1998).

Le manifestazioni della malattia nelle piante di albicocco e di susino cino-giapponese sono note da tempo ed ampiamente diffuse nelle nostre coltivazioni (Giunchedi *et al.*, 1982);

sintomi simili a quelli osservati sui susini cino-giapponesi sono stati riscontrati anche in susini europei nella valle del Sarca (TN) autoradicati od innestati su "Marianna GF 8/1" (Poggi Pollini *et al.*, 1995). Recenti ricerche effettuate in Friuli hanno dimostrato come il fitoplasma agente di queste affezioni sia trasmesso in natura dallo psillide *Cacopsylla pruni* (Carraro *et al.*, 1998). Una ricerca effettuata nel corso del biennio 1999-2000 in vari pescheti situati nelle provincie di Forlì-Cesena, Ravenna e Verona, per valutare la reale diffusione della fitoplasmosi, ha permesso di delineare in maniera più precisa la reale situazione della diffusione di ESFYP nei peschi, dopo le sporadiche segnalazioni degli anni precedenti (Poggi Pollini *et al.*, 2001). Nei frutteti visitati le piante, di numerose cultivar, interessate da sintomi tipici della fitoplasmosi erano di solito l'1-2% del totale, con punte del 3-4%, nella maggior parte dei casi innestate su "GF 677" e raramente su franco.

La maggior parte dei campioni sintomatici è risultata infetta esclusivamente da ESFYP in base ai risultati della reazione a catena della polimerasi (PCR), della PCR ripetuta (nested-PCR) e della determinazione immunoenzimatica dei prodotti amplificati (PCR-ELISA) utilizzando una sonda specifica per ESFYP (Poggi Pollini *et al.*, 2001).

Rilievi di campo effettuati nel biennio 2000-2001 nelle aziende a vocazione peschicola situate nella bassa valle del Sarca (TN) hanno permesso di osservare piante di diverse cultivar con sintomi riferibili a ESFYP quali arrossamento fogliare precoce, ingrossamento del rachide, precoce filloptosi e sviluppo verso la fine dell'estate di gemme da legno e da fiore con produzione di germogli con foglie piccole e clorotiche.

Il presente lavoro si è posto l'obiettivo di valutare la presenza e la diffusione di questa fitoplasmosi nei pescheti del basso Sarca.

MATERIALI E METODI

Rilievi di campo e sintomatologia

L'indagine è stata effettuata durante l'autunno 2000, nella primavera e nell'autunno del 2001 in 6 aziende a vocazione peschicola situate nella valle del Sarca (TN), nelle località di Drò, Ceniga, Pratosaiano (3 appezzamenti) e Sant'Alessandro di Riva per un totale di 4,5 ettari.

Le manifestazioni più caratteristiche sono state notate nel periodo autunnale sotto forma di un accentuato arrossamento fogliare, le foglie inoltre ripiegavano i margini verso l'alto, parallelamente alla nervatura mediana, assumevano una lieve torsione all'indietro e presentavano un portamento pendulo. Era poi talvolta presente un accentuato ingrossamento del rachide e delle nervature principali delle foglie e la formazione di tessuto suberificato perinervale; la lamina fogliare inoltre di solito tendeva ad assumere una consistenza friabile, cartacea e le foglie a cadere precocemente. Questi sintomi molto spesso interessavano soltanto una branca o qualche ramo di una pianta. Il sintomo più tipico e frequente era comunque l'entrata in vegetazione della gemma terminale e di quelle ascellari dei rametti interessati dalla malattia, con la produzione di brevi germogli con gli internodi raccorciati e con l'emissione di foglie piccole e clorotiche e saltuaria emissione di fiori. Nei frutteti visitati sono state riscontrate in totale una ventina di piante interessate dall'alterazione, con un'incidenza inferiore all'1%; si trattava sempre di alberi innestati su "GF 677" delle varietà "Royal Gem", "Big Top", "Caldesi 2000", "Maria Laura" e "Maria Aurelia".

Accanto ai sintomi sopradescritti sono state individuate anche una decina di piante che presentavano sintomi piuttosto aspecifici di deperimento, talvolta risultante nella morte della pianta nel corso dell'annata; le analisi di laboratorio sono state effettuate anche su 10

campioni con queste sintomatologie. Sono state inoltre utilizzate per le analisi 15 piante di pesco asintomatiche raccolte in prossimità delle piante con sintomi e 10 piante, sempre asintomatiche, raccolte in due appezzamenti (Drò e Sant'Alessandro di Riva) dove non sono mai state riscontrate piante di pesco con sintomi, nelle cui vicinanze, comunque, sono stati riscontrati susini o albicocchi con sintomi riferibili alla fitoplasmosi.

Nel corso dell'inverno 2001 sono stati effettuati sopralluoghi per verificare se piante risultate infette dal fitoplasma nella stagione precedente presentassero una ripresa anticipata della vegetazione; sulla maggior parte di esse è stata notata l'emissione precoce di foglie e fiori a inizio Febbraio, non sempre presente nel caso del pesco (Poggi Pollini *et al.*, 2001).

Diagnosi molecolare mediante reazione a catena della polimerasi e determinazione immunoenzimatica dei prodotti amplificati

L'estrazione del DNA totale della pianta è stata eseguita da 55 campioni di pesco prelevati in vari periodi dell'anno, da vari appezzamenti e da diverse varietà, di cui venti con i sintomi descritti, da sette piante di susino e tre di albicocco con sintomi riferibili a fitoplasmi situate nelle vicinanze dei pescheti, da dieci peschi sani, allevati in serra e da cinque piante di susino cino-giapponese, riscontrate infette da ESFYP, allevate in serra e utilizzate come testimoni infetti.

Da ciascun campione è stato prelevato un grammo di materiale costituito da nervature fogliari o tessuto floematico, sminuzzato in 11 ml di tampone di estrazione freddo (125 mM fosfato di potassio, 30 mM acido ascorbico, 10% saccarosio, 0,15% albumina bovina, frazione V, 2% polivinilpirrolidone K 10) in presenza di sabbia di quarzo sterilizzata. L'estrazione del DNA è stata quindi eseguita con un protocollo standard.

Per ottenere l'amplificazione genica (PCR diretta) sono state utilizzate due coppie di iniziatori di cui una (R16F2/R2), universale per i fitoplasmi, che consente l'amplificazione di un frammento di rDNA di circa 1200 paia di basi (Lee *et al.*, 1995), utilizzato per le successive prove di PCR ripetuta (nested-PCR); l'altra (ECA 1/2), specifica per ESFYP, che consente l'amplificazione di un frammento di DNA non-ribosomale, di circa 240 paia di basi (Jarausch *et al.*, 1998). La reazione di amplificazione è stata effettuata su un volume totale di 40 µl contenenti 10-15 ng di DNA, 100 nM dei 2 primer, 100 µM dei 4 deossinucleotidi e 1,25 unità di Taq polimerasi (Klentaq, Bionova).

I prodotti inizialmente amplificati con la coppia di iniziatori R16F2/R2 sono stati diluiti 1:40 ed aliquote di 2 µl sono state usate per prove di nested-PCR al fine anche di evidenziare fitoplasmi di altri gruppi tassonomici eventualmente presenti nel pesco, utilizzando le seguenti coppie di iniziatori gruppo-specifici: R16(I)F1/R1 (specifico per i gruppi del giallume dell'astro e dello stolbur), R16(III)F2/R1 (gruppo della malattia X dei *Prunus*) e R16(X)F1/R1 (gruppo degli scopazzi del melo) (Lee *et al.*, 1998; Seemuller *et al.*, 1998), i cui prodotti attesi sono di circa 1100 paia di basi, tranne la seconda coppia di 800 (Lee *et al.*, 1995). L'amplificazione è stata condotta con un termocicizzatore Perkin-Elmer Cetus 480 con i seguenti cicli termici: 94 °C (60 sec), 50 °C (120 sec.) e 72 °C (180 secondi) per 34 cicli più un ciclo finale in cui la durata della permanenza a 72 °C era prolungata a 10 minuti (R16F2/R2, R16(I)F1/R1, R16(III)F2/R1 e R16(X)F1/R1); 95 °C (15 sec.), 55 °C (15 sec.) e 72 °C (30 sec.) per 40 cicli (ECA 1/2). L'assenza di contaminazioni durante l'amplificazione è stata verificata utilizzando anche campioni di controllo privi di DNA.

I prodotti amplificati ottenuti con la coppia di primer R16 (X) F1/R1 sono stati digeriti con gli enzimi di restrizione *Alu* I e *Rsa* I (Gibco BRL) al fine di ottenere una precisa caratterizzazione molecolare: ad ogni campione (10 µl di prodotto PCR) sono state aggiunte

1,5-2 unità di enzima e 1,2 µl del tampone appropriato; tutti i campioni sono stati incubati per una notte a 37 °C.

Per la identificazione dei fitoplasmi presenti nei peschi, i profili di restrizione ottenuti sono stati confrontati con quelli ottenuti dal giallume europeo delle drupacee su susino (ESFYP; 16Sr X-A) e dalla moria del pero su pero (PD; 16Sr X-C) (Lee *et al.*, 1998).

I prodotti amplificati ottenuti sono stati analizzati su gel di agarosio all'1 o 2% in tampone TBE 0,5 x.

La determinazione enzimatica dei prodotti amplificati è stata preceduta da amplificazione genica utilizzando la coppia di primer fOI/rOI con il seguente ciclo: 94 °C (60 sec.), 55 °C (75 sec.) e 72 °C (90 sec.) per 35 cicli. La soluzione di amplificazione conteneva un nucleotide legato alla digossigenina (PCR-ELISA labelling mix - Roche Diagnostic, Milano Italia).

Aliquote di 10 µl dei prodotti amplificati sono state ibridate in fase liquida con una sonda specifica per ESFYP, costituita da un oligonucleotide di 20 basi, biotinilato all'estremità 5', interno al segmento del gene 16S RNA amplificato dalla coppia di iniziatori fOI/rOI (Poggi Pollini *et al.*, 2001); il complesso è stato legato a piastre ELISA rivestite di streptavidina.

E' seguita la reazione tra la digossigenina incorporata nel prodotto amplificato e l'anticorpo specifico, legato all'enzima perossidasi di ravanella, l'aggiunta del substrato 2',2'-Azino-di-(3'etilenbenzotiazolo solfonato) diammonio (ABTS) e la lettura in piastra ELISA a 405 nm della variazione colorimetrica che interviene in seguito all'interazione enzima-substrato.

Le condizioni ottimali della procedura determinate sperimentalmente sono state: 12 ore di incubazione a 40 °C con la sonda alla concentrazione di 50 pmol/ml di tampone di incubazione; 1 h di incubazione con l'antisiero a 37 °C e 15 min di incubazione con il substrato alla stessa temperatura (Poggi Pollini *et al.*, 2001).

RISULTATI

I metodi di diagnosi utilizzati hanno permesso di individuare la presenza di ESFYP nella gran parte delle piante di pesco con le manifestazioni sintomatologiche tipiche sopradescritte: 18 su 20, pari al 90% delle piante esaminate, mentre il patogeno non è mai stato riscontrato nelle altre piante di pesco esaminate.

Il fitoplasma è stato anche riscontrato in tutte le piante di susino utilizzate come controlli positivi e nei susini ed albicocchi, con sintomi tipici, riscontrati nelle immediate vicinanze degli impianti di pesco (Tab. 1).

La nested-PCR effettuata con le coppie di primer gruppo-specifici, il taglio dei prodotti amplificati con endonucleasi e l'analisi dei profili di restrizione hanno evidenziato l'esclusiva presenza di ESFYP in tutte le drupacee risultate positive ai saggi di biologia molecolare.

La tabella 1 mostra anche l'efficacia dei vari metodi di diagnosi utilizzati: la determinazione immunoenzimatica dei prodotti amplificati con la sonda specifica utilizzata ha permesso di individuare il fitoplasma in un numero maggiore di piante rispetto alla PCR diretta con primer non-ribosomiali; tale tecnica ha inoltre mostrato la stessa sensibilità della nested-PCR.

Tab. 1 – Piante di pesco ed altre drupacee saggiate e risultate positive e sensibilità dei vari metodi di diagnosi utilizzati.

PIANTE ESAMINATE	DIAGNOSI CON		
	PCR DIRETTA	PCR-ELISA	NESTED-PCR
Peschi con sintomi tipici	16/20*	18/20	18/20
Peschi con sintomi aspecifici	0/10	0/10	0/10
Peschi asintomatici	0/25	0/25	0/25
Altre drupacee sintomatiche**	9/10	10/10	10/10
Drupacee sane**	0/15	0/15	0/15

* = numeratore = campioni vegetali infetti; denominatore = campioni vegetali saggiati.

**= infezione o assenza d'infezione determinata in prove preliminari mediante nested-PCR.

CONCLUSIONI

La ricerca effettuata negli anni 2000-2001 negli impianti peschicoli della Valle del Sarca (TN) ha permesso l'identificazione, in buona parte degli appezzamenti esaminati, di un numero, per il momento ancora molto limitato, di piante di pesco infette da ESFYP.

I risultati ottenuti hanno evidenziato la presenza del fitoplasma in pressochè tutte le piante di pesco con manifestazioni conclamate della fitoplasmosi tra cui, oltre all'accartocciamento fogliare, anche l'anomala ripresa vegetativa di gemme terminali ed ascellari e l'eventuale emissione di fiori nella stagione autunnale, come riscontrato in un'indagine più ampia effettuata in vari impianti peschicoli dell'Italia Centro-Settentrionale. L'emissione precoce di foglie e fiori, alla ripresa della stagione vegetativa, è stata rilevata nella quasi totalità delle piante di pesco risultate infette da ESFYP, anche se in altre aree peschicole tale manifestazione è risultata meno frequente (Poggi Pollini *et al.*, 2001). Le piante con manifestazioni di deperimento, spesso seguite da morte, non sono invece mai risultate infette da ESFYP, nemmeno con la nested-PCR: i sintomi riscontrati sembrerebbero dovuti a altre cause, soprattutto a ristagno idrico; anche le piante di pesco asintomatiche raccolte in prossimità delle piante infette e nei due appezzamenti sono risultate esenti della fitoplasmosi (Tab. 1).

I dati ottenuti finora sul comportamento di ESFYP in pesco indicano come tale drupacea reagisca all'infezione del fitoplasma con la produzione di sintomi piuttosto evidenti, soprattutto se le piante sono innestate, come anche per i peschi oggetto di questo studio, sul portinnesto "GF 677"; il numero limitato di piante risultate infette, ci ha impedito, invece, di ricavare indicazioni precise sulla sensibilità varietale, anche se alcune cv (Royal Gem e Maria Aurelia) avevano già mostrato un certo numero di individui infetti in campo (Poggi Pollini *et al.*, 2001).

Le tecniche di diagnosi molecolare utilizzate hanno permesso di individuare esclusivamente ESFYP nelle piante di pesco colpite; in particolare è stata esclusa la presenza del fitoplasma dell'accartocciamento fogliare giallo del pesco (PYLR= peach yellow leaf roll phytoplasma) che appartiene allo stesso gruppo degli "scopazzi del melo", diffuso per ora solo in Nord-America (Seemuller *et al.*, 1998) e del fitoplasma della malattia X dei *Prunus*, saltuariamente riscontrato in Italia su fruttiferi (Lee *et al.*, 1995). Il reperimento esclusivo di ESFYP in piante di pesco concorda, comunque, pienamente con le precedenti ricerche effettuate in Francia su un campione molto elevato di drupacee, di cui però solo poche piante

di pesco (Jarausch *et al.*, 1998), e negli impianti peschicoli del Veneto ed Emilia-Romagna, esaminati recentemente (Poggi Pollini *et al.*, 2001).

In conclusione, la presenza della fitoplasmosi negli impianti peschicoli esaminati nella valle del Sarca sembra avere ancora un'incidenza ed importanza economica estremamente limitata, sebbene nel corso dei rilievi sia stato notato un lieve incremento nel numero delle piante infette. La gravità dei danni e la diffusione, però, di tale affezione su cultivar sensibili di albicocco, susino cino-giapponese e susino europeo nelle vicinanze degli impianti peschicoli, indicano che è necessario mostrare un certo grado di attenzione per contenere l'ulteriore diffusione del fitoplasma nei pescheti. A questo proposito potrebbe essere utile la distruzione delle piante con sintomi accentuati. Le indagini, proseguiranno per valutare altri aspetti epidemiologici della malattia quali l'importanza delle drupacee spontanee come eventuali sorgenti d'inoculo, l'eventuale presenza del vettore della malattia, la *C. pruni* e per individuare eventuali forme di contenimento.

RINGRAZIAMENTI

Lavoro eseguito nell'ambito del programma di ricerca finanziato dal MIPAF sulle biotecnologie vegetali: Area di ricerca 10 "I diagnostici" Titolo del progetto: produzione di diagnostici per la diagnosi e la caratterizzazione di fitoplasmi dei fruttiferi

LAVORI CITATI

- CARRARO L., OSLER R., LOI N., ERMACORA P., REFATTI E., 1998. Transmission of European fruit yellows phytoplasma by *Cacopsylla pruni*. *Journal of Plant Pathology*, 80, 233-239.
- GIUNCHEDI L., POGGI POLLINI C., CREDI R., 1982. Susceptibility of stone fruit trees to the Japanese plum-tree decline casual agent. *Acta Horticulturae*, 130, 285-290.
- JARAUSCH W., LANSAC M., SAILLARD C., BROQUAIRE J.M., DOSBA F., 1998. PCR assay for specific detection of European stone fruit yellows phytoplasmas and its use for epidemiological studies in France. *European Journal of Plant Pathology*, 104, 17-27.
- 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., GUNDERSEN-RINDAL D.E., DAVIS R.E., BARTOSZYK I.M., 1998. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48, 1153-1169.
- POGGI POLLINI C., BISSANI R., GIUNCHEDI L., VINDIMIAN E., 1995. Occurrence of phytoplasma infection in European plums (*Prunus domestica*). *Journal of Phytopathology*, 143, 701-703.
- POGGI POLLINI C., BISSANI R., GIUNCHEDI L., 2001. Occurrence of European Stone Fruit Yellows Phytoplasma (ESFYP) infection in peach orchards in Northern-Central Italy. *Journal of Phytopathology*, 149, 725-730.
- SEEMULLER E., MARCONE C., LAUER U., RAGOZZINO A., GOSCHL M., 1998. Current status of molecular classification of the phytoplasmas. *Journal of Plant Pathology*, 80, 3-26.