

INDAGINI SULLA PRESENZA DEL FITOPLASMA DEL GIALLUME EUROPEO DELLE DRUPACEE (ESFYP) IN PIANTE SPONTANEE DI *PRUNUS MAHALEB*

C. POGGI POLLINI⁽¹⁾, F. TERLIZZI⁽¹⁾, L. GIUNCHEDI⁽¹⁾,
P. MIORELLI⁽²⁾, E. VINDIMIAN⁽²⁾

⁽¹⁾ DiSTA, Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali, Patologia Vegetale, Alma Mater Studiorum, Università di Bologna, via F.Re 8, I-40126, (BO) giunched@agrsci.unibo.it

⁽²⁾ Istituto Agrario di S. Michele all'Adige, via Mach, 1, I- 38100, S. Michele all'Adige (TN)

RIASSUNTO

Piante spontanee di *Prunus mahaleb* con sintomi riferibili a fitoplasmi (emissione anticipata delle foglie rispetto a quella dei fiori e/o scopazzi sui rami) sono state riscontrate durante rilievi di campo effettuati nel corso del 2003 nella valle del Sarca (TN). Il fitoplasma del giallume europeo delle drupacee (ESFYP) è stato identificato in tutte le piante con sintomi mediante metodi di diagnosi e caratterizzazione molecolare (PCR-ELISA, RFLP-PCR). ESFYP era già stato riscontrato in varie altre specie spontanee del genere *Prunus* (*P.cerasifera*, *P. domestica*, *P. spinosa*); *P. mahaleb* era, invece, considerato estremamente resistente all'infezione. È ancora da chiarire il possibile ruolo nella epidemiologia della malattia di questa specie spontanea, estremamente diffusa nella valle del Sarca, dove il giallume europeo delle drupacee è endemico e la sua diffusione è in crescita.

Parole chiave: giallume europeo delle drupacee, *Prunus mahaleb*, PCR-ELISA

SUMMARY

STUDY OF WILD *PRUNUS MAHALEB* INFECTED BY EUROPEAN STONE FRUIT YELLOW PHYTOPLASMA (ESFYP)

In 2003 during field surveys of wild *Prunus* species in the lower Sarca valley (TN), several uncultivated trees of *Prunus mahaleb* were observed with phytoplasma-like symptoms such as off-season growth and/or witches' broom. In all the symptomatic plants examined, only ESFYP was detected using PCR-ELISA and RFLP-PCR. It has already been established that several *Prunus* species (*P.cerasifera*, *P. domestica*, *P. spinosa*) represent good hosts for ESFYP, as well as for the insect vector. In contrast *P. mahaleb* is considered to be highly resistant to ESFYP-infection. Research is continuing with the main aim of assessing the possible role played by *P. mahaleb*, extremely common in this fruit-growing area, in the epidemiology of the European stone fruit yellow.

Key words: European stone fruit yellow, *Prunus mahaleb*, molecular detection, PCR-ELISA

INTRODUZIONE

Il termine "giallume europeo delle drupacee" riunisce oggi un gruppo di sindromi note in passato con i termini di accartocciamento fogliare clorotico dell'albicocco, del pesco e del susino, leptonecrosi del susino e giallume del pesco (Giunchedi *et al.*, 1982). Queste affezioni sono indotte da un solo agente patogeno: il fitoplasma del giallume europeo delle drupacee (European stone fruit yellow phytoplasma= ESFYP), l'unico fitoplasma riconosciuto come patogeno in Europa su specie del genere *Prunus*. Esso appartiene al gruppo monofiletico degli scopazzi del melo (Sr X) ed è fortemente correlato per le caratteristiche genetiche con i fitoplasmi agenti degli scopazzi del melo (Apple proliferation = AP) e della moria del pero (Pear decline = PD) (Seemüller *et al.*, 1998), molto diffusi nelle coltivazioni italiane delle due pomacee.

In Italia il giallume europeo delle drupacee è particolarmente frequente nelle coltivazioni di albicocco (*Prunus armeniaca*) e susino cino-giapponese (*Prunus salicina*) dell'Emilia-Romagna, Friuli, Toscana, Veneto, Trentino Alto-Adige; si trova pure nelle coltivazioni della Campania e del Lazio (Poggi Pollini *et al.*, 2002a). La diffusione della fitoplasmosi negli impianti di pesco (*Prunus persica*) era considerata trascurabile fino a pochi anni fa, ma risulta in crescita costante negli ultimi anni in vari comprensori peschicoli. Ciò è probabilmente dovuto ad un aumento delle popolazioni del vettore del fitoplasma, lo psillide *Cacopsylla pruni* Scopoli, a causa di variazioni ambientali e/o all'utilizzo nella difesa di prodotti insetticidi con minore azione di contenimento nei confronti del fitofago. Il fitoplasma sarebbe anche ampiamente diffuso nelle coltivazioni di susino europeo (*Prunus domestica*), dove peraltro rimane quasi sempre allo stato latente; in particolare nella valle del Sarca (TN) la malattia è frequente negli impianti della varietà europea "Prugna di Drò" costituiti con piante autoradicate od innestate su "Marianna GF 8-1" (Poggi Pollini *et al.*, 2002a). Negli ultimi anni sono stati inoltre identificate varie specie spontanee di *Prunus*, in primo luogo *P. cerasifera*, *P. domestica* e *P. spinosa*, comunemente presenti ai bordi dei coltivi che rivestirebbero un ruolo importante nel ciclo epidemiologico della malattia, in quanto ospiti sia del fitoplasma che dell'insetto vettore. Tali piante, di solito asintomatiche, costituirebbero una pericolosa sorgente d'inoculo per ESFYF, da cui gli insetti assumerebbero il fitoplasma per trasmetterlo alle drupacee coltivate (Jarausch *et al.*, 2001; Carraro *et al.*, 2002; Poggi Pollini *et al.*, in stampa). Il *Prunus padi* non è invece mai stato riscontrato infetto in natura (Carraro *et al.*, 2002). Ancora incerto è, infine, il ruolo di altre piante spontanee riscontrate sporadicamente infette dal fitoplasma del giallume europeo delle drupacee (*Celtis australis*, *Corylus avellana*, *Fraxinus excelsior*, *Rosa canina*, *Rubus fruticosus*) (Jarausch *et al.*, 2001).

Riguardo al *Prunus mahaleb*, una specie estremamente diffusa nelle valle del Sarca, rilievi di campo effettuati nell'autunno 2002, avevano permesso di osservare ai bordi dei coltivi piante spontanee, con sintomi riferibili a fitoplasmii. Il presente lavoro si è posto l'obiettivo di valutare l'eventuale presenza e diffusione di ESFYF anche in questa specie spontanea.

MATERIALI E METODI

Rilievi di campo e sintomatologia

L'indagine è stata effettuata durante la primavera e verso la fine dell'estate 2003 in tre località della valle del Sarca (Massone, Ceniga e Drò) nelle immediate vicinanze di appezzamenti di pesco, susino cino-giapponese, ed europeo.

Le manifestazioni più caratteristiche sono state riscontrate in primavera su due piante di una ventina di anni con emissione fogliare anticipata rispetto a quella dei fiori, localizzata ad alcune branche della chioma, leptonecrosi e produzione di rametti con internodi raccorciati con la formazione di scopazzi portanti foglie di dimensioni più piccole del normale. Durante la stagione autunnale sulle branche interessate è stata notata la presenza di foglie leggermente clorotiche e con la lamina che tendeva ad assumere una forma più oblunga e ad accartocciarsi verso l'alto parallelamente alla nervatura mediana.

La produzione di rametti fittamente affastellati, talvolta accompagnata da emissione anticipata delle foglie è stata osservata anche in alcune piante giovani.

Oltre alle piante di *P. mahaleb*, nelle zone individuate sono state raccolte anche piante spontanee di *P. spinosa* senza sintomi apparenti e varie piante di drupacee coltivate con sintomi riferibili al giallume europeo delle drupacee. La tabella 1 riporta le località di raccolta, il numero delle piante analizzate ed il tipo di sintomo riscontrato.

Tabella 1 – Riassunto dei dati di campo, con le specie, le località di raccolta ed i sintomi osservati

SPECIE ESAMINATE	SINTOMI OSSERVATI	LOCALITA'
<i>P. DOMESTICA</i> (3)	Sintomi tipici (3)*	CENIGA
<i>P. MAHALEB</i> (15)	- Emissione anticipata delle foglie + Scopazzo (2) - Scopazzo (1) - Assenza di sintomi (12)	
<i>P. SALICINA</i> (3)	Sintomi tipici (3)	
<i>P. SPINOSA</i> (5)	Assenza di sintomi (5)	
<i>P. DOMESTICA</i> (4)	Sintomi tipici (4)	DRO'
<i>P. MAHALEB</i> (15)	Assenza di sintomi (15)	
<i>P. PERSICA</i> (5)	Sintomi tipici (5)	
<i>P. SPINOSA</i> (5)	Assenza di sintomi (5)	
<i>P. DOMESTICA</i> (3)	Sintomi tipici (3)	MASSONE
<i>P. MAHALEB</i> (20)	- Emissione anticipata delle foglie + Scopazzo (1)- Scopazzo (3) - Assenza di sintomi (16)	
<i>P. SPINOSA</i> (5)	Assenza di sintomi (5)	

* tra parentesi il numero delle piante con sintomi di giallume europeo o i sintomi riscontrati

Estrazione del DNA totale e diagnosi molecolare

L'estrazione del DNA totale della pianta è stata eseguita da 50 campioni di *P. mahaleb* di cui 7 con i sintomi descritti, da 15 campioni di *P. spinosa*, da 18 piante di drupacee coltivate con sintomi riferibili a fitoplasmi (tabella 1) e da dieci peschi sani, allevati in serra e utilizzati come testimoni sani. 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 eseguita con un protocollo standard.

La determinazione enzimatica dei prodotti amplificati (PCR-ELISA) è stata preceduta da amplificazione genica utilizzando la coppia di primer fOl/rOl, con un termocicizzatore Perkin-Elmer Cetus 480, con il seguente ciclo: 94 °C (60 sec.), 55 °C (75 sec.) e 72 °C (90 sec.) per 35 cicli ed è stata effettuata con una sonda specifica per ESFYP, con le condizioni sperimentali descritte in precedenza (Poggi Pollini *et al.*, 2001b).

Al fine di evidenziare fitoplasmi di altri gruppi tassonomici eventualmente presenti nei campioni è stata inoltre effettuata un'amplificazione genica con la coppia di primer universali per i fitoplasmi R16F2/R2 che consente l'amplificazione di un frammento di rDNA di circa 1200 paia di basi (Lee *et al.*, 1995). I prodotti così amplificati sono stati diluiti 1:40 ed aliquote di 2 µl sono state usate per prove di nested-PCR, utilizzando le seguenti coppie di primer 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(V)F1/R1 (gruppo del

giallume dell'olmo), i cui prodotti attesi sono di circa 1100 paia di basi, tranne la seconda coppia di 800 (Lee *et al.*, 1995; 1998). Le reazioni di amplificazione sono state effettuate in 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), con il seguente ciclo termico: 94°C (60 sec.), 50°C (120 sec.) e 72°C (180 sec.) per 34 cicli più un ciclo finale di 10 minuti a 72°C.

I prodotti amplificati ottenuti con la coppia di primer fOI/rOI, sono stati digeriti con gli enzimi di restrizione *AluI* e *RsaI* (Gibco BRL) al fine di ottenere una precisa caratterizzazione molecolare: ad ogni campione (10 µl di prodotto PCR) sono stati 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. I profili di restrizione ottenuti dalle piante raccolte in campo sono stati confrontati con quelli ottenuti dal giallume europeo delle drupacee su pesco (16Sr X-B) (Lee *et al.*, 1998). I prodotti amplificati e quelli digeriti sono stati analizzati su gel di agarosio all'1 o 2% in tampone TBE 0,5 x.

RISULTATI

I metodi di diagnosi utilizzati hanno permesso di individuare la presenza di ESFYP, in entrambi i periodi di raccolta dei campioni, in tutte le piante di *P. mahaleb* con sintomi ed in due piante di *P. spinosa*, asintomatiche, corrispondenti rispettivamente al 14 e 13,3% delle piante esaminate. L'infezione nelle due specie menzionate è stata riscontrata solo in due (Ceniga e Massone) delle tre zone d'indagine. ESFYP è stato anche riscontrato in tutte le drupacee coltivate che manifestavano sintomi tipici della fitoplasmosi, raccolte in tutte le zone di indagine, ma non nelle piante di pesco utilizzate come controllo (tabella 2).

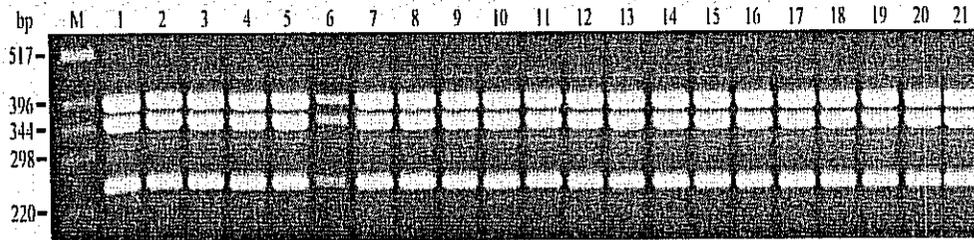
Tabella 2 – Risultati delle analisi molecolari

SPECIE ESAMINATE	DIAGNOSI CON PCR-ELISA (campioni positivi/saggiati)	LOCALITA' DI RACCOLTA CAMPIONI POSITIVI (numero piante infette)
<i>P. DOMESTICA</i>	10/10	CENIGA (3) - DRO' (4) - MASSONE (3)
<i>P. MAHALEB</i>	7/50*	CENIGA (3) - MASSONE (4)
<i>P. PERSICA</i>	5/5	DRO' (5)
<i>P. SALICINA</i>	3/3	CENIGA (3)
<i>P. SPINOSA</i>	2/15**	CENIGA (1) - MASSONE (1)

* = sono risultate infette solo le piante sintomatiche ** = piante asintomatiche

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 confermato che l'unico fitoplasma presente nei campioni risultati positivi, compresi quelli di *P. mahaleb*, era ESFYP; oltre a ciò i campioni di *P. mahaleb* esaminati hanno mostrato lo stesso profilo di restrizione, identico a quelli dei campioni di pesco di riferimento utilizzati (figura 1).

Figura 1 – Profili di restrizione, ottenuti impiegando l'enzima *RsaI*, di amplificati con la coppia di primer f01/r01. Bande attese per ESFYP: 394-352-253 paia di basi (bp)



M= marker 1kb ladder; 1-3= campioni di riferimento: peschi infetti da ESFYP; 4-12= drupacee coltivate raccolte nella valle del Sarca con sintomi tipici (4, 5 peschi; 6-8 susini cino-giapponesi; 9-12 susini europei); 13-14= piante di *P. spinosa* asintomatiche; 15-21= piante di *P. mahaleb* con sintomi

CONCLUSIONI

La ricerca effettuata nell'anno 2003 nella valle del Sarca ha permesso di identificare, in due delle tre zone esaminate, situate in prossimità di appezzamenti coltivati a drupacee, piante spontanee di *P. mahaleb* infette dal fitoplasma del giallume europeo delle drupacee. I risultati ottenuti hanno evidenziato la presenza di ESFYP in tutte le piante di *P. mahaleb* che presentavano manifestazioni riferibili a fitoplasmi; tra queste la più diffusa è risultata la presenza di rametti con internodi raccorciati e la conseguente formazione di scopazzi, mentre l'emissione fogliare anticipata rispetto ai fiori è stata riscontrata solo saltuariamente. Tutte le piante asintomatiche sono risultate, invece, esenti dalla fitoplasmosi. Riguardo al *P. spinosa* l'infezione è stata riscontrata in due piante senza alcun sintomo riferibile alla fitoplasmosi; questi dati concordano con osservazioni precedenti. I dati finora ottenuti avevano indicato come il fitoplasma del giallume europeo delle drupacee di solito rimanesse latente o si manifestasse con sintomi poco evidenti (Jarusch *et al.*, 2001; Carraro *et al.*, 2002) in effetti anche due piante di *P. spinosa* infette, ma asintomatiche sono state riscontrate nelle nostre analisi.

Tutte le tecniche di diagnosi molecolare utilizzate hanno permesso di individuare solo ESFYP sia nelle drupacee spontanee che in quelle coltivate con sintomi tipici della fitoplasmosi. Il reperimento esclusivo di tale fitoplasma anche nelle drupacee spontanee, concorda pienamente con precedenti ricerche effettuate (Jarusch *et al.*, 2001; Carraro *et al.*, 2002; Poggi Pollini *et al.* in stampa). L'analisi dei profili di restrizione ottenuti dopo digestione enzimatica dei prodotti amplificati ha mostrato inoltre come quelli associati ai campioni di *P. mahaleb* siano risultati identici a quelli ottenuti dai campioni di drupacee di riferimento utilizzati.

Il lavoro eseguito mirava a verificare l'eventuale importanza nella diffusione del giallume europeo delle drupacee di piante spontanee del genere *Prunus* presenti nelle zone limitrofe a coltivazioni di drupacee nella valle del Sarca. Vari autori avevano già suggerito il possibile ruolo nell'epidemiologia di tale affezione di *P. cerasifera* e *P. spinosa*, in quanto ospiti sia del patogeno che dell'insetto vettore (Jarusch *et al.*, 2001; Carraro *et al.*, 2002); l'importanza del *P. mahaleb* era invece considerata finora nulla. In particolare prove sperimentali condotte per valutare l'attitudine di diverse specie del genere *Prunus* all'ovideposizione ed alla sopravvivenza di individui di *C. pruni* avevano evidenziato che il *P. mahaleb* non consente

l'ovideposizione e la sopravvivenza della psilla per un periodo superiore a 14 giorni (Carraro *et al.*, 2002). Prove di trasmissione per innesto avevano inoltre dimostrato come l'infezione sia trasmissibile a *P. mahaleb* e *P. padus* con estrema difficoltà, tanto che queste due specie sono a tutt'oggi considerate altamente resistenti (Ferrini *et al.*, 2002).

Il reperimento di piante di *P. mahaleb* naturalmente infette da ESFYP e con sintomi evidenti è così particolarmente interessante in quanto costituisce la prima segnalazione di una nuova specie, ospite naturale del fitoplasma. L'elevata percentuale di piante riscontrate infette (7 su 50, pari al 14%) evidenzia poi la necessità di approfondire il possibile ruolo nel ciclo epidemiologico della malattia di una specie, particolarmente diffusa nella valle del Sarca, dove la malattia è endemica ed in progressivo, costante incremento (Poggi Pollini *et al.*, 2002b).

RINGRAZIAMENTI

Lavoro eseguito nell'ambito del progetto finanziato dal MIUR (ex 40%): "Biodiversità di virus, viroidi e fitoplasmi di piante coltivate di grande interesse economico in ambiente mediterraneo".

LAVORI CITATI

- CARRARO L., FERRINI F., ERMACORA P., NAZIA L., 2002. Role of wild *Prunus* species in the epidemiology of European stone fruit yellows. *Plant Disease*, 51, 513-517.
- FERRINI F., CARRARO L., ERMACORA P., NAZIA L., 2002. Trasmissione del fitoplasma di European stone fruit yellows a differenti specie di *Prunus*, mediante vettore ed innesto. *Petria*, 12, 367-368.
- 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., JARAUSCH-WEHRHEIM B., DANET J.L., BROQUAIRE J.M., DOSBA F., SAILLARD C., GARNIER M., 2001. Detection and identification of European stone fruit yellows and other phytoplasmas in wild plants in the surroundings of apricot chlorotic leaf roll-affected orchards in southern France. *European Journal of Plant Pathology*, 107, 209-217.
- LEE I.M., BERTACCINI A., 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., 2002a. Il fitoplasma del giallume europeo delle drupacee (ESFYP): il punto sulla diffusione in Italia. *Informatore Fitopatologico*, 52(5), 13-17.
- POGGI POLLINI C., MIORELLI P., BISSANI R., TERLIZZI F., AGNOLIN C., 2002b. Diffusione del fitoplasma del giallume europeo delle drupacee (ESFYP) in impianti peschicoli nella valle del Sarca (TN). *ATTI Giornate fitopatologiche*, 2002, 2, 571-576.
- POGGI POLLINI C., BISSANI R., GIUNCHEDI L., DRADI D., MORI N., VISIGALLI T. Detection of European Stone Fruit Yellows Phytoplasma (ESFYP) in *Homoptera* insects and in wild stone fruit trees collected in peach orchards in Northern Italy. In stampa.
- 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.