

**DIFFERENTI REAZIONI INDOTTE IN SUSINO CINO-GIAPPONESE  
(*PRUNUS SALICINA*) DA INFEZIONI OTTENUTE MEDIANTE INNESTI DI  
MATERIALE INFETTO DA '*CANDIDATUS PHYTOPLASMA PRUNORUM*'**

M. PASTORE<sup>1</sup>, F. GERVASI<sup>1</sup>, M. DEL VAGLIO<sup>1</sup>, M. PETRICCIONE<sup>1</sup>, A. BERTACCINI<sup>2</sup>

<sup>1</sup> CRA Unità di Ricerca per la Frutticoltura di Caserta - Via Torrino, 3, 81100 Caserta

<sup>2</sup> MUR *Alma Mater Studiorum* di Bologna Di.S.T.A. - Viale Fanin, 42, 40127 Bologna

Pastore2000@inwind.it

**RIASSUNTO**

Le gemme di tre susini cino-giapponesi, appartenenti alle cv Midnight Star, Songold e Midnight Sun, risultate infette da '*Candidatus Phytoplasma prunorum*', sono state innestate su astoni di mirabolano da seme e mantenuti in serra. Un anno dopo l'innesto solo due piante su 15 sono risultate infette, per cui le rimanenti 13 sono state inoculate, mediante un innesto a tassello, con tessuti di piante infette della cv Stanley. L'anno successivo altre sei piante sono risultate infette e, durante gli otto anni di sperimentazione, quattro delle otto piante infette sono morte dopo aver manifestato i tipici sintomi della fitoplasmosi, mentre nelle altre quattro si è assistito al fenomeno del risanamento, confermato dalla negatività dei test utilizzati per la diagnosi dei fitoplasmii.

**Parole chiave:** susino cino-giapponese, '*Candidatus Phytoplasma prunorum*', innesto a gemma, innesto a tassello, risanamento

**SUMMARY**

**DIFFERENT REACTIONS OF JAPANESE PLUM (*PRUNUS SALICINA* LINDL.)  
INFECTED THROUGH GRAFTING WITH '*CANDIDATUS PHYTOPLASMA  
PRUNORUM*'**

Shoots collected from three Chino-Japanese plum plants infected by '*Candidatus Phytoplasma prunorum*', were employed for phytoplasma transmission by bud grafting on mirabolano rootstocks under greenhouse. One year after grafting the pathogen was only detected in two plants out of the 15 grafted therefore the remaining 13 plants were chip-budding inoculated with infected cv Stanley plum. After 2 years six out of thirteen inoculated plum plants resulted infected. In the eight years of the experiment an half of these plants died and the other half resulted free of phytoplasmas.

**Keywords:** Japanese plum, '*Candidatus Phytoplasma prunorum*', bud-grafting, chip-budding grafting, recovery

**INTRODUZIONE**

Il susino cino-giapponese (*Prunus salicina* Lindl.) è una specie molto sensibile alla leptonecrosi, fitoplasmosi associata a '*Candidatus Phytoplasma prunorum*'. Fino ad oggi, su questa specie, da parte dell'Unità di Ricerca per la Frutticoltura di Caserta, sono state saggiate piante infettate mediante vettori in pieno campo (Pastore *et al.*, 2002), effettuate inoculazioni di tessuti con piante infette su pianta sana (Pastore *et al.*, 2001), sono stati ricercati i vettori dell'infezione in Lazio ed in Campania (Pastore *et al.*, 2004), e sono state effettuate prove di trasmissione con *Empoasca decedens* spp. sotto rete anti-insetto (Pastore *et al.*, 2005).

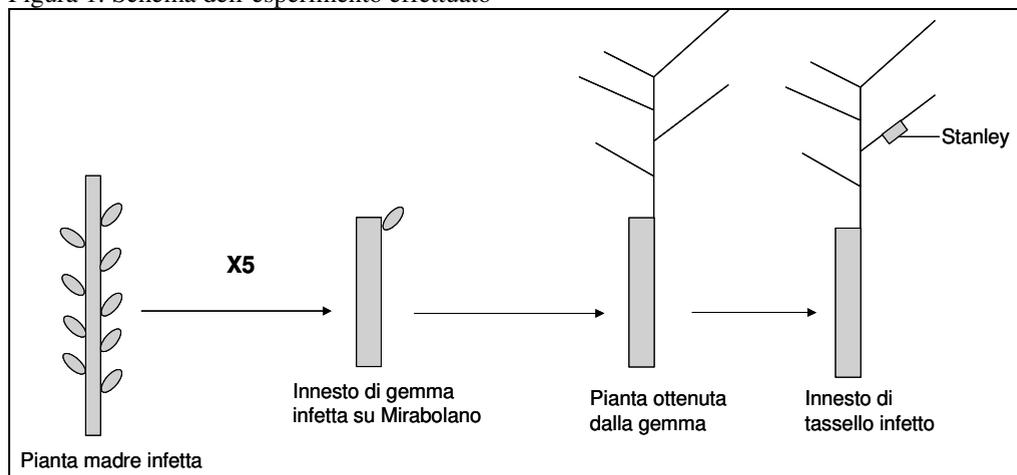
Il presente lavoro è stato svolto moltiplicando gemme da materiale infetto, studiando il decorso dell'infezione e seguendo l'evoluzione dell'infezione indotta mediante innesto a tassello durante otto anni di sperimentazione.

## MATERIALI E METODI

Rami di tre piante di susino cino-giapponese, mostranti sintomi di anticipazione di fioritura, accartocciamento fogliare e disseccamento di intere branche, furono sottoposti nel 1998 ad indagine molecolare per verificare la presenza di infezione da fitoplasmi. I rami appartenevano a tre varietà: Midnight Star, Songold e Midnight Sun.

La sperimentazione è proseguita utilizzando 15 piante di mirabolano da seme mantenute in serra di tessuto antiafide ed è stata effettuata per verificare se mediante innesto a gemma fosse possibile trasmettere il patogeno. Dai rami infetti sono state prelevate delle gemme per ottenere, nel 1999, 5 piante di ogni varietà. Campioni fogliari provenienti dagli innesti a gemma sono stati analizzati mediante estrazione degli acidi nucleici con fenolo/cloroformio e amplificazione dell'estratto mediante PCR diretta con "primer" che amplificano il DNA ribosomico dei fitoplasmi, in particolare sono stati utilizzati P1/P7 (Deng e Hiruki, 1991; Schneider *et al.*, 1995) nella prima reazione seguita da amplificazioni "nested" con i "primer" R16F2/R2 e R16(X)F1/R1 (Lee *et al.*, 1995). Per verificare la suscettibilità delle tre varietà al patogeno, le piante risultate sane sono state inoculate nuovamente con tessuto di susino cino-giapponese "Stanley", infetto dallo stesso patogeno, ed analizzate ogni anno fino al luglio 2007 (figura 1).

Figura 1. Schema dell'esperimento effettuato



## RISULTATI

I test molecolari hanno confermato che i campioni fogliari raccolti nel 1998 dai tre susini

Tabella 1. Prova di trasmissione di 'Ca. P. prunorum' mediante innesto a gemma della pianta infetta su cinque piante sane di mirabolano da seme

Piante madri infette Anno 1997	N° di piante infette sulle 5 ottenute da innesto a gemma della pianta madre. Anno 1998	N° di piante morte Anno 2005	N° di piante risanate Anno 2007
Midnight Star	0	0	0
Songold	1	1	0
Midnight Sun	1	0	1

“Midnight Star”, “Songold” e “Midnight Sun” erano positivi alla presenza di ‘*Ca. P. prunorum*’. Dopo la moltiplicazione mediante innesto a gemma, sia “Songold” che “Midnight Sun” diedero origine ad una pianta infetta; la pianta ottenuta dalla gemma di “Songold” seccò nel 2005 mentre la pianta ottenuta da “Midnight Sun” risultò risanata nel 2007 (tabella 1).

Gli inoculi a tassello trasmisero il patogeno e 6 piante sulle 13 inoculate risultarono infette dopo due anni dall’inoculo; tre di queste seccarono nel 2007 e le altre tre risultarono risanate (tabella 2).

Tabella 2. Prova di trasmissione di ‘*Ca. P. prunorum*’ mediante innesto a tassello di “Stanley” infetto

Cultivar	N° di piante sane, ottenute da gemme infette, inoculate mediante innesto a tassello Anno 1999	N° di piante infette dopo due anni dall’inoculo a tassello Anno 2001	N° di piante morte Anno 2007	N° di piante risanate
Midnight Star	5	3	2	1
Songold	4	0	0	0
Midnight Sun	4	3	1	2

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Risulta interessante notare che: 1) il ‘*Ca. P. prunorum*’, qualora presente nella gemma dormiente di susino cino-giapponese, è in grado di replicarsi al punto da invadere i tessuti floematici della pianta intera ottenuta dalla gemma stessa; 2) l’inoculo a tassello di susino infetto su susino sano è un metodo efficace per indurre l’infezione, tuttavia, in caso di mancata trasmissione, non si può concludere che la varietà inoculata non possa essere stata infettata dal fitoplasma, poiché la pianta madre, allevata in pieno campo, era risultata infetta; 3) quattro piante infette su otto sono completamente seccate, dopo 7 anni dall’inoculo; 4) quattro piante infette su otto hanno reagito alla presenza del fitoplasma, risultando risanate. Occorre però precisare che ad una di queste piante era stato potato il ramo, completamente secco, sul quale era stato effettuato l’inoculo del patogeno.

Studi effettuati, per un identico periodo, da altri autori, su vite, hanno dimostrato un’altissima percentuale di risanamento, inteso come assenza di sintomi da fitoplasmosi in piante che ne erano infette (Romanazzi *et al.*, 2007). Sono in corso studi per capire se questo tipo di risanamento sia da correlare alla diversa virulenza del patogeno (Loi *et al.*, 2007), alla migrazione dei fitoplasmosi a livello radicale (Carraro *et al.*, 2004), sia influenzato dalla presenza di funghi endofiti in grado di indurre resistenza (Musetti *et al.*, 2007b) o strettamente associato all’accumulo di perossido di idrogeno (Musetti *et al.*, 2007a).

Attualmente sono in corso ulteriori approfondimenti, su albicocco e pero, allo scopo di studiare la differenza tra l’evoluzione della fitoplasmosi indotta artificialmente e quella della fitoplasmosi acquisita naturalmente (Pastore *et al.*, 2008).

## Ringraziamenti

Lavoro svolto nell’ambito del progetto finalizzato Mi.P.A.F. "FRU.MED". Sottoprogetto “D.A.F.M.E.” Pubblicazione n° 27.

Si ringrazia l’operaio agricolo specializzato, sig. Giovanni Palumbo, per avere, con entusiasmo e alta professionalità, effettuato gli innesti a gemma e a tassello per la trasmissione del patogeno e per avere personalmente dedicato particolare cura alla serra di tessuto antifide che custodiva le piante di questo esperimento.

## LAVORI CITATI

- Carraro L., Ermacora P., Loi N., Osler R., 2004. The recovery phenomenon in apple proliferation-infected apple trees. *Journal of Plant Pathology*, 86, 141-146.
- Deng S., Hiruki C., 1991. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and nonculturable *Mollicutes*. *Journal of Microbiological Methods*, 14, 53-61.
- 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.
- Loi N., Ferrini F., Loschi A., 2007. Recovery e giallume europeo delle drupacee: un caso studio. *Atti del Convegno Nazionale "Nuove possibilità di lotta contro le fitoplasmosi della vite e dei fruttiferi basate su recovery, resistenze indotte e antagonisti"*. 15-16.
- Musetti R., Marabottini R., Badiani M., Martini M., Sanità di Toppi L., Borselli S., Borgo M., Osler R., 2007a. On the role of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the recovery of grapevine (*Vitis vinifera* cv Prosecco) from Flavescence dorée disease. *Functional Plant Biology*, 34 (8), 750-758.
- Musetti R., Martini M., Borselli S., Osler R., 2007b. Basi del recovery: possibile ruolo di funghi endofiti. *Atti del Convegno Nazionale "Nuove possibilità di lotta contro le fitoplasmosi della vite e dei fruttiferi basate su recovery, resistenze indotte e antagonisti."* 17-19.
- Pastore M., Paltrinieri S., Petriccione M., Priore R., Bertaccini A., 2005. *Empoasca decedens* P. and *Empoasca* spp. possible vectors of 16SrX-B phytoplasmas in *Prunus domestica* L. and in *Prunus salicina* Lindl. *Petria*, 1, 197-198.
- Pastore M., Paltrinieri S., Priore R., Simeone A.M., Raffone E., Santonastaso M., Bertaccini A., 2004. Phytoplasma detection in *Empoasca decedens* Paoli and *Empoasca* spp. and their possible role as vector of European stone fruit yellows (16SrX-B) phytoplasma. *Acta Horticulturae*, 657, 507-511.
- Pastore M., Petriccione M., Paltrinieri S., del Vaglio M., Gervasi F., Bertaccini A., 2008. Research on phytoplasma persistence in pear and apricot trees under protected environment. [www.she2008.eu](http://www.she2008.eu)
- Pastore M., Simeone A.M., Raffone E., Paltrinieri S., Botti S., Bertaccini A., 2002. Diffusione naturale di leptonecrosi in un campo collezione di susino. Natural spreading of leptonecrosis in a plum collection field. *Atti VI Giornate Scientifiche SOI*, 133-134.
- Pastore M., Tian J., Simeone A.M., Paltrinieri S., Piccirillo P., Bertaccini A., 2001. Transmission by patch-grafting of ESFY phytoplasma to apricot (*Prunus armeniaca* L.) and Japanese plum (*Prunus salicina* LINDL). *Acta Horticulturae*, 550, 339-344.
- Romanazzi G., Prota V.A., Casati P., Murolo S., Silletti M.R., Di Giovanni R., Landi L., Zorloni A., D'Ascenzo D., Virgili S., Garau R., Savino V., Bianco P.A., 2007. Incidenza del recovery in viti infette da fitoplasma in diverse condizioni climatiche e varietali italiane e tentativi di comprensione ed induzione del fenomeno. *Atti del Convegno Nazionale "Nuove possibilità di lotta contro le fitoplasmosi della vite e dei fruttiferi basate su recovery, resistenze indotte e antagonisti"*. 9-11.
- Schneider E., Seemuller E., Smart C.D., Kirkpatrick B.C., 1995. Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organism or phytoplasmas. In: Razin S., J.G. Tully (eds.). *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmaology*, 1, Academic Press, San Diego, pp. 369-380.