

**DIAGNOSI UNIVERSALE E SPECIFICA
DI FITOPLASMI IN VITE, MELO ED INSETTI VETTORI
MEDIANTE REAL TIME PCR**

**L. Galetto^{1,2}, D. Bosco²,
R. Tedeschi², C. Marzachi¹**

¹Istituto di Virologia Vegetale, CNR,
Strada delle Cacce, 73, I-10135 Torino

²Di.Va.P.R.A. Entomologia e Zoologia applicate all'Ambiente "Carlo Vidano",
Università di Torino, Via L. da Vinci 44,
I-10095 Grugliasco (TO)

Flavescenza dorata (FD), legno nero (LN) e scopazzi del melo (AP) sono gravi malattie associate a fitoplasmi (FD, 16Sr-V; BN, 16Sr-XII; AP, 16Sr-X) nella vite (*Vitis vinifera*) le prime due e nel melo (*Malus domestica*) la terza (Lee *et al.*, 2000). FD e AP sono considerati organismi da quarantena in Europa e pertanto sono necessari strumenti rapidi e sensibili per la loro diagnosi ed identificazione. A questo scopo sono stati messi a punto tre metodi diagnostici specifici per il rilevamento in Real Time PCR di FD, LN e AP e uno per l'identificazione universale di fitoplasmi. Per ogni protocollo diagnostico è stata effettuata un'ottimizzazione utilizzando diverse diluizioni di plasmidi contenenti l'amplicone corrispondente e il DNA totale di isolati di riferimento di fitoplasmi mantenuti in pervinca. La diagnosi è stata poi eseguita sul DNA totale estratto da piante ed insetti vettori raccolti in campo, in anni diversi (dal 2001 al 2004), in areali piemontesi e valdostani. Le analisi gruppo-specifiche sono state effettuate su 209 viti e 20 meli di campo e su 18 adulti di *Scaphoideus titanus*, 31 di *Hyalesthes obsoletus*, vettori rispettivamente di FD e LN vite, e 25 di *Cacopsylla melanoneura*, vettore di AP al melo. La diagnosi universale è stata effettuata su tre campioni di ogni specie già risultati infetti con un titolo elevato, medio e basso di fitoplasma. Sono stati realizzati nuovi primers per la diagnosi di LN ed AP mentre, per rilevare la presenza di FD, inneschi già disponibili (Marzachi *et al.*, 2001) sono stati adattati all'utilizzo in Real Time PCR. La diagnosi universale è stata effettuata con reagenti disegnati per la quantificazione del fitoplasma chrysanthemum yellows (16Sr-I) (Marzachi e Bosco, 2005). Per il rilevamento di FD, LN ed AP è stato utilizzato il colorante SYBR® Green I accoppiato alla curva di melting, mentre per la diagnosi universale una sonda TaqMan.

La diagnosi specifica ha rilevato FD con efficienza, rispetto al metodo convenzionale (Marzachi, 2004), del 94% sia su vite che su *S. titanus*. La diagnosi specifica per LN ha mostrato un'efficienza, rispetto al metodo convenzionale (Marzachi, 2004), del 92% e del 100%, su vite e *H. obsoletus*, rispettivamente. La diagnosi specifica per AP ha rilevato il patogeno con efficienza, rispetto al metodo

convenzionale (Marzachi, 2004), del 100% sia su melo che su *C. melanoneura*. Nei tre sistemi diagnostici, l'analisi della curva di melting è stata necessaria per valutare la specificità dei prodotti di PCR, quando ottenuti da campioni con bassa concentrazione del patogeno. La diagnosi universale ha rilevato il patogeno con la stessa efficienza dei metodi specifici in tutti i campioni di campo analizzati.

La Real Time PCR si è dimostrata un'ottima tecnica per la diagnosi delle fitoplasmi. L'efficienza diagnostica di tutti i sistemi considerati è risultata pressoché analoga a quella dei diversi metodi convenzionali di diagnosi, tutti caratterizzati da più passaggi (PCR indiretta o PCR/dot-blot) e seguiti da una fase di rilevamento del risultato (elettroforesi, RFLP). I reagenti ottenuti possono essere utilizzati per un approccio quantitativo allo studio delle relazioni tra il fitoplasma, la pianta ospite e l'insetto vettore, come recentemente proposto per AP (Jarausch *et al.*, 2004), onion yellows (Wei *et al.*, 2004), CY (Marzachi e Bosco, 2005) e per fitoplasmi appartenenti a diversi gruppi tassonomici (Christensen *et al.*, 2004).

Parole chiave: FD, LN, AP, Vettori, Diagnosi.

Summary

Universal and specific diagnosis of phytoplasmas in grapevine, apple and insect vectors by real time PCR

Flavescence dorée (FD), bois noir (BN) and apple proliferation (AP) are severe diseases associated with phytoplasmas (FD, 16Sr-V; BN, 16Sr-XII; AP, 16Sr-X) in two of the most economically important fruit tree species in Europe, such as grapevine (*Vitis vinifera*) and apple (*Malus domestica*) (Lee *et al.*, 2000). FD and AP are classified as quarantine organisms in the UE, therefore, rapid and sensitive tools for detection and identification of these phytoplasmas are needed. Real Time PCR was applied in a universal phytoplasma diagnostic method and in three group-specific assays in order to detect FD, BN and AP. The new diagnostic assays were optimised using different concentrations of plasmids containing the corresponding amplicons and total DNAs of reference isolates maintained in periwinkle. Diagnosis was performed on total DNAs extracted from plants and insect vectors, field-collected in Piemonte and Val d'Aosta in different years (since 2001 to 2004). Group-specific diagnosis was carried out on 209 grapevine plants and 20 apple trees, on 18 adult *Scaphoideus titanus* and 31 *Hyalesthes obsoletus*, vectors of FD and BN to grapevine, respectively, as well as on 22 individuals of *Cacopsylla melanoneura*, vector of AP to apple. Phytoplasma universal diagnosis was performed on three samples of each species previously classified as highly, medium and poorly phytoplasma-infected. New primers were designed to detect BN and AP, while an available FD-specific primer pair (Marzachi *et al.*, 2001) was fitted on the Real Time diagnostic assay. The reagents recently

used to quantify chrysanthemum yellows (CY, 16Sr-I) phytoplasma (Marzachi and Bosco, 2005) were employed for universal diagnosis. SYBR® Green I coupled with melting curve analysis and a TaqMan probe were used as detection systems for group-specific and universal diagnosis, respectively.

Group-specific diagnosis detected the presence of FD with efficiencies, compared to conventional method (Marzachi, 2004), of 94% on grapevines and *S. titanus*. Group-specific diagnosis detected the presence of BN with efficiencies, compared to conventional method, of 92% and 100% on grapevines and *H. obsoletus*, respectively. AP-specific diagnosis detected the presence of the pathogen with efficiencies, compared to conventional method, of 100% on apple trees and *C. melanoneura*. Melting curve analysis was necessary to avoid false positive results especially in the presence of a low phytoplasma concentration. Universal diagnosis detected phytoplasmas with the same efficiency as group-specific assays in all test samples.

The diagnostic assays described in this work are single-step methods with nearly the same efficiency as the conventional ones, which are, on the contrary, double-step analysis (nested PCR or PCR/dot-blot), followed by a detection phase (electrophoresis, RFLP). These Real Time PCR methods can also be used in a quantitative approach to study the relationships among phytoplasmas, host plants and insect vectors, as it has been recently reported for AP (Jarausch *et al.*, 2004), onion yellows (Wei *et al.*, 2004), CY (Marzachi and Bosco, 2005) and for phytoplasmas belonging to different taxonomic groups (Christensen *et al.*, 2004).

Key words: FD, BN, AP, Vectors, Diagnosis.

Lavori citati

- CHRISTENSEN N.M., M. NICOLAISEN, M. HANSEN, A. SCHULZ, 2004. Distribution of phytoplasmas in infected plants as revealed by Real-Time PCR and Bioimaging. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **17**, 1175-1184.
- JARAUSCH W., T. PECCERELLA, N. SCHWIND, B. JARAUSCH-WEHRHEIM, G. KRCZAL, 2004. Establishment of a quantitative Real-Time PCR assay for the quantification of apple proliferation phytoplasmas in plants and insects. *Acta Horticulturae*, **657**, 415-420.
- LEE I.-M., R.E. DAVIS, D.E. GUNDERSEN-RINDAL, 2000. Phytoplasma: phytopathogenetic mollicutes. *Annual Review of Microbiology*, **54**, 221-255.
- MARZACHÌ C., 2004. Molecular diagnosis of phytoplasmas. *Phytopathologia Mediterranea*, **43**, 228-231.
- MARZACHÌ C., D. BOSCO, 2005. Relative quantification of phytoplasma in their plant and insect hosts: a Real Time PCR based method to quantify CY (16Sr I) phytoplasma in infected daisy and leafhopper vector. *Molecular Biotechnology*, **30**, 117-127.

- MARZACHÌ C., S. PALERMO, A. BOARINO, F. VERATTI, M. D'AQUILIO, A. LORIA, G. BOCCARDO, 2001. Optimisation of one step PCR assay for the diagnosis of Flavescence dorée-related phytoplasmas in field-grown grapevines and vector populations. *Vitis*, **40**, 213-217.
- WEI W., S. KAKIXAWA, S. SUZUKI, H.-Y. JUNG, H. NISHIGAWA, S. MIYATA, K. OSHIMA, M. UGAKI, T. HIBI, S. NAMBA, 2004. In planta dynamic analysis of onion yellows phytoplasma using localized inoculation by insect transmission. *Phytopathology*, **94**, 244-250.

Autore di riferimento: Luciana Galetto Tel. 011 3977271 - e-mail: luciana.galetto@unito.it