

**CARATTERIZZAZIONE DI FITOPLASMI ASSOCIATI AL
LEGNO NERO (LN) DELLA VITE IN LIGURIA, PIEMONTE,
SARDEGNA, SICILIA E VALLE D'AOSTA**

**D. Pacifico¹, A. Alma², M. Tessitori³,
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)

³Dipartimento di Scienze e Tecnologie Fitosanitarie (DISTEF),
Università di Catania, Via S. Sofia, 100, I-95124 Catania

Il Legno Nero è un'importante fitopatia della vite, presente nelle principali aree a vocazione viticola, associata alla presenza di un fitoplasma (LN) appartenente al gruppo tassonomico 16SrXII (Stolbur). In Europa e nel Bacino del Mediterraneo, il fitoplasma associato al Legno Nero appartiene al sottogruppo 16SrXII-A. Fitoplasmi appartenenti allo stesso sottogruppo tassonomico sono stati segnalati anche in numerose specie vegetali, coltivate e spontanee. *Hyalesthes obsoletus* Signoret è vettore della fitopatia alla vite (Maixner *et al.*, 1994; Sforza *et al.*, 1998) mentre *Pentastiridius beieri* (Wagner) è stato segnalato come vettore di Stolbur a specie erbacee (Gatineau *et al.*, 2001). Recentemente in Germania sono stati caratterizzati tre isolati di Stolbur trasmessi da *H. obsoletus* e presenti nella vite ma caratterizzati da diversa specificità di ospite spontaneo (*Urtica dioica*, *Convolvulus arvensis* and *Calystegia sepium*) (Langer e Maixner, 2004).

La variabilità della popolazione di fitoplasmi appartenenti al gruppo Stolbur, presenti in infezione singola in viti provenienti da diverse Regioni italiane (Liguria, Piemonte, Sardegna, Sicilia e Valle d'Aosta) è stata analizzata mediante analisi i) del polimorfismo di restrizione (RFLP) (Langer e Maixner, 2004) e ii) del polimorfismo della singola elica (SSCP; Šeruga *et al.*, 2004) del gene codificante per il fattore di elongazione Tu. Le stesse analisi sono state condotte anche su singoli individui di *H. obsoletus* raccolti nel 2004 in un vigneto infetto con LN in Valle d'Aosta.

L'analisi RFLP ha evidenziato la presenza nei territori regionali considerati di due differenti popolazioni di LN, riconducibili ai due isolati di riferimento riportati in letteratura come VK-I e VK-II (Langer e Maixner, 2004). Alcuni isolati provenienti dalla Sardegna hanno tuttavia evidenziato la presenza di un terzo profilo. Un solo profilo RFLP, del tipo VK-I, è stato invece evidenziato negli esemplari di *H. obsoletus* provenienti dal singolo vigneto valdostano.

L'analisi SSCP ha permesso di riconoscere nelle viti e negli esemplari di *H. obsoletus* analizzati 4 profili.

Entrambe le tecniche utilizzate hanno confermato una buona sensibilità nel rilevare le differenze tra diversi isolati ed un'elevata riproducibilità dei risultati. La tecnica SSCP ha mostrato una maggiore sensibilità. I profili SSCP ottenuti sono stati riproducibili, costanti e, almeno secondo i dati preliminari ottenuti, distribuiti in tutte le Regioni prese in considerazione. La stessa tecnica applicata alla caratterizzazione di LN in vite, ha invece evidenziato una variabilità molto maggiore in Croazia (Šeruga *et al.*, 2004). La tecnica SSCP ha rilevato fitoplasmi con lo stesso profilo negli insetti vettori provenienti da un singolo vigneto, confermando pertanto la sua potenzialità per la caratterizzazione di isolati geografici. I dati preliminari ottenuti indicano quindi che, anche in Italia, il Legno Nero della vite è associato a isolati diversi di fitoplasmi appartenenti al gruppo tassonomico 16SrXII-A.

Parole chiave: RFLP, SSCP, *Vitis vinifera*, *Hyalesthes obsoletus*, Bois Noir.

Summary

Characterisation of phytoplasmas associated with “Bois noir” (BN) in grapevines from Liguria, Piemonte, Sardegna, Sicilia e Valle D’Aosta

Bois Noir is an important disease of grapevine in European and Italian traditional grapevine growing regions. The disease is associated with a phytoplasma belonging to the 16SrXII taxonomic group (Stolbur). The Bois Noir associated phytoplasma (BN) in Europe and Mediterranean regions belongs to the subgroup 16SrXII-A. Phytoplasmas of the same subgroup infect a wide range of cultivated and wild plants. The planthopper *Hyalesthes obsoletus* Signoret is the vector of BN to grapevine (Maixner *et al.*, 1994; Sforza *et al.*, 1998) while *Pentastiridius beieri* (Wagner) is known to transmit BN to erbaceous hosts.

Recently, three BN isolates have been characterised in Germany in the vector *H. obsoletus* as well as in infected grapevines and wild hosts. Each isolate showed a specific association with a different vineyard weed (*Urtica dioica*, *Convolvulus arvensis* and *Calystegia sepium*) (Langer and Maixner, 2004).

Infected grapevines were collected in different Italian Regions (Liguria, Piemonte, Sardegna, Sicilia and Valle d’Aosta). Genetic variability of Italian Stolbur phytoplasmas was assayed by 1) restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis (Langer and Maixner, 2004) and 2) single strand conformation profile (SSCP) analysis (Šeruga *et al.*, 2004) of partial phytoplasma Elongation Factor Tu gene sequence. Seven *H. obsoletus* individuals sampled in one BN-infected vineyard in Valle d’Aosta were also analysed.

RFLP analysis evidenced the presence of two BN isolates, reported in the literature as VK-Type I and VK-Type II (Langer and Maixner, 2004). These two isolates were detected in all the regional areas, although some Sardinian

isolates showed a different RFLP profile. Only VK-Type I RFLP profile was obtained from *H. obsoletus* individuals collected in Valle d'Aosta.

SSCP analysis of infected grapevines and *H. obsoletus* samples showed four profiles.

Both RFLP and SSCP analysis differentiated among BN isolates and showed high sensitivity and reproducibility of results. SSCP produced more sequence information than RFLP. The obtained SSCP profiles were reproducible and constant. Moreover, our preliminary results showed that the same 4 profiles were present in all the geographic Regions under analysis. On the other hand, the same technique showed a much higher sequence variability when used for the characterization of the BN population in grapevines from Croatia (Šeruga *et al.*, 2004). Identical SSCP profiles were also obtained from the *H. obsoletus* individuals sampled in one vineyard in Valle d'Aosta, therefore proving that the technique has good potential in the characterization of BN geographic isolates. Our preliminary results have shown that also in Italy different isolates of BN are associated to the disease in grapevine.

Key words: RFLP, SSCP, *Vitis vinifera*, *Hyalesthes obsoletus*, Bois Noir.

Lavori citati

- GATINEAU R., J. LARRUE, D. CLAIR, F. LORTON, M. RICHARD-MOLARD, E. BOUDON-PADIEU, 2001. A new natural planthopper vector of stolbur phytoplasma in the genus *Pentastiridius* (Hemiptera: Cixiidae). *European Journal of Plant Pathology*, **107**, 263-271.
- LANGER M., M. MAIXNER, 2004. Molecular characterisation of grapevine yellows associated phytoplasmas of the stolbur-group based on RFLP-analysis of non-ribosomal DNA. *Vitis*, **43**, 191-200.
- MAIXNER M., U. AHRENS, E. SEEMÜLLER, 1995. Detection of the German grapevine yellows MLO in grapevine, alternative hosts and a vector by a specific PCR procedure. *European Journal of Plant Pathology*, **101**, 241-250.
- ŠERUGA M.M., M. KRAJACIĆ, D. ŠKORIĆ, 2004. SSCP analysis as an approach for comparison of phytoplasma isolates. Proceeding of the 15th IOM Meeting, Athens, Georgia, 11-16/07/2004, p. 56, Abstr. 23.
- SFORZA R., D. CLAIR, X. DAIRE, J. LARRUE, E. BOUDON-PADIEU, 1998. The role of *Hyalesthes obsoletus* (Hemiptera: Cixiidae) in the occurrence of Bois Noir of grapevines in France. *Journal of Phytopathology*, **146**, 549-556.