

## CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI ISOLATI DI LEGNO NERO NELL'ITALIA CENTRALE E MERIDIONALE

**G. Pasquini<sup>1</sup>, L. Ferretti<sup>1,2</sup>, G. Albanese<sup>2</sup>, M. Barba<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>C.R.A. - Istituto Sperimentale per la Patologia Vegetale  
Via C.G. Bertero, 22, I-00156 Roma

<sup>2</sup>Dipartimento di Agrochimica e Agrobiologia,  
Università Mediterranea di Reggio Calabria  
Piazza S. Francesco di Sales, 4, 89061 Gallina (Reggio Calabria)

Indagini effettuate nelle aree vocate alla coltivazione della vite nell'Italia centrale e meridionale hanno evidenziato una estesa diffusione di giallumi attribuibili a Legno Nero (LN). Tale malattia, sintomatologicamente non distinguibile dalla Flavescenza Dorata (FD), è indotta da fitoplasmi appartenenti prevalentemente al gruppo 16SrXII. Il Legno Nero è considerato meno pericoloso di FD perché non epidemico e trasmesso meno efficientemente dai cicadellidi vettori rispetto a FD. La sua recrudescenza, tuttavia, ha stimolato negli ultimi tempi indagini al fine di migliorare le conoscenze sull'eziologia e l'epidemiologia della malattia.

Trentaquattro viti con sintomatologie evidenti sono state individuate in aree viticole del centro e sud Italia (Campania, Lazio, Calabria e Sicilia) ed i relativi campioni fogliari sono stati sottoposti a caratterizzazione molecolare. L'individuazione del gruppo di appartenenza dei fitoplasmi responsabili della malattia è stata effettuata mediante amplificazione del gene 16S rRNA con i primers universali P1/P7 (Deng and Hiruki, 1991; Schneider *et al.*, 1995), seguita da nested-PCR utilizzando i primers R16(I)F1/R1 (Lee *et al.*, 1994) e analisi del polimorfismo dei frammenti di restrizione ottenuti dopo digestione degli amplificati con l'enzima *Mse* I. Gli isolati sono stati identificati anche mediante analisi del profilo di restrizione su un frammento amplificato con i primers 16R758F/M23Sr (Gibb *et al.*, 1995; Padovan *et al.*, 1995), dopo digestione con l'enzima *Taq*I. I risultati di tali analisi hanno evidenziato, nella quasi totalità dei campioni, la presenza di fitoplasmi appartenenti al gruppo 16SrXII.

Successivamente sono state effettuate analisi RFLP di sequenze del gene Tuf, meno conservato del 16S rDNA e codificante un cofattore Tu per l'allungamento della catena polipeptidica (Schneider *et al.*, 1997), al fine di accertare eventuali differenze genetiche nell'ambito della popolazione del fitoplasma Stolbur.

Sulla base del polimorfismo di restrizione, ottenuto dopo digestione con l'enzima *Hpa*II dei frammenti specifici amplificati dal gene Tuf, sono stati individuati 2 distinti profili. Il primo, a cui si riferisce come Pattern 1 e non distinguibile dallo isolato STOL XII-A (ceppo serbo, isolato da peperone), è stato rinvenuto su 22 piante di vite infette provenienti da tutte le regioni indagate. Un secondo profilo, Pattern 2, ha evidenziato una minore diffusione geografica, essendo stato rinvenuto solo nel Lazio ed in Calabria in 10 piante di vite. I due profili, indipendentemente dall'area

geografica e dalla varietà indagata, non sono stati mai rinvenuti contemporaneamente all'interno di uno stesso vigneto, in accordo con la eventuale diffusione ad opera di cicadellidi vettori di questi ceppi distinguibili molecularmente.

Due campioni di vite isolati in Campania e Lazio hanno, invece, evidenziato profili di restrizione non assimilabili ai due gruppi riscontrati e sono attualmente oggetto di approfondimento.

Individui di *Hyalestes obsoletus* Signoret, rinvenuti in vigneti in osservazione, sono risultati positivi all'indagine molecolare effettuata per evidenziare la presenza del fitoplasma Stolbur. La ulteriore caratterizzazione molecolare effettuata sul gene Tuf ha confermato sempre la presenza nei cicadellidi dello stesso pattern rilevato nei vigneti in cui gli insetti erano stati catturati.

**Parole chiave:** Legno nero, Caratterizzazione, Stolbur, Gene Tuf.

### Summary

#### **Molecular characterization of grapevine Stolbur isolates in central and southern Italy**

Thirty four grapevine infected plants have been identified in some areas of central and southern Italy (Campania, Latium, Calabria and Sicily regions). Midribs excised from infected leaves, collected in August-October, have been analyzed in direct PCR using universal primers P1/P7 (Deng and Hiruki, 1991; Schneider *et al.*, 1995) followed by nested-PCR with specific primers R16(I)F1/R1 (Lee *et al.*, 1994) and RFLP analysis with *MseI* restriction enzyme. All analyzed samples resulted infected by phytoplasma belonging to 16SrXII group. These results were confirmed by amplifications with primers 16R758F/M23Sr (Gibb *et al.*, 1995; Padovan *et al.*, 1995) followed by RFLP analysis with *TaqI* restriction enzyme.

RFLP analysis performed on Tuf gene sequences allowed to further characterize the BN isolates. This gene is less conserved than 16S rRNA and encodes an elongation factor, allowing the individuation of genetic differentiations among Stolbur isolates (Schneider *et al.*, 1997).

Tuf gene of each BN isolate was amplified and successively digested with *HpaII* enzyme. RFLP analysis allowed to differentiate two major patterns, referred as Pattern 1 and Pattern 2. Pattern I was identical to and not distinguishable from STOL XII-A isolate (Serbian pepper). It was identified in 22 grapevine infected plants coming from all considered regions and resulted the most spread among BN isolates. Pattern II showed a smaller geographical distribution and was identified only in Latium and Calabria regions in 10 grapevine infected plants.

It is important to point out that in single vineyards or specific areas only one type of pattern was always identified, no matter of grapevine cultivar or geographical influence, suggesting the possibility of specific vector transmission of each genetic differentiable isolate.

Only two grapevine samples, one from Campania and one from Latium regions, showed two restriction patterns different from those previously described. Studies are carried out on these isolates to better understand the genetic differentiation and their real diffusion.

Molecular analysis of DNA extracted from *Hyalestes obsoletus* Signoret samples, collected in some observed vineyards, revealed the presence of Stolbur phytoplasma. The further molecular characterization performed on Tuf gene confirmed the presence of the same pattern revealed in the vineyard in which the insects were collected.

**Key words:** Bois noir, Characterization, Stolbur, Tuf gene.

### Lavori citati

- DENG S., C. HIRUKI, 1991. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and non-culturable mollicutes. *Journal of Microbiologica Methods*, **14**, 53-61.
- GIBB K., A.C. PADOVAN, B.D. MOGEN, 1995. Studies on sweet potato little-leaf phytoplasma detected in sweet potato and other plants species growing in northern Australia. *Phytopathology*, **85**, 169-174.
- LEE I.-M., D.E. GUNDERSEN-RINDAL, R.W. HAMMOND, R.E. DAVIS, 1994. Use of Micoplasma like organism (MLO's) group specific oligonucleotide primers for nested-PCR assay to detect mixed MLO infections in a single host plant. *Phytopatology*, **84**, 449-566.
- PADOVAN A.C., K.S. GIBB, A. BERTACCINI, M. VIBIO, R.E. BONFIGLIOLI, P.A. MAGAREY, B.B. SEARS, 1995. Molecular detection of the Australian grapevine yellows phytoplasmas and comparison with grapevine yellows phytoplasmas from Italy. *Australian Journal Grape Wine Research*, **1**, 25-31.
- SCHNEIDER B., M.T COUSIN, S. KLINGKONG, E. SEEMÜLLER, 1995. Taxonomic relatedness and phylogenetic positions of phytoplasmas associated with disease of faba bean, sunnhemp, sesame, soybean and eggplant. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, **102**, 225-232.
- SCHNEIDER B., K.S. GIBB, E. SEEMÜLLER, 1997. Sequence and RFLP analysis of the elongation factor Tu gene used in differentiation and classification of phytoplasmas. *Microbiology*, **143**, 3381-3389.

Lavoro svolto nell'ambito del P.F. "I giallumi della vite" finanziato dal Ministero delle Politiche Agricole e Forestali.

Autore di riferimento: Graziella Pasquini - e-mail: g.pasquini@ispave.it