

VARIABILITA' MOLECOLARE DI FITOPLASMI 16SrXII IN VIGNETI DELLE PROVINCE DI MODENA E REGGIO EMILIA

**S. Botti¹, S. Paltrinieri¹, N. Mori⁴, L. Milanesi³,
R. Bondavalli², A. Bertaccini¹**

¹Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali (DiSTA),
Università di Bologna, Viale Fanin, 44, I-40127 Bologna

²Consorzio Fitosanitario Provinciale di Reggio Emilia,
Via Gualerzi, 32, I-42100 Reggio Emilia

³Consorzio Fitosanitario Provinciale di Modena,
Via Andreoli, 13, I-41100 Modena

⁴Area Centro Studi, Via Garibaldi, 5,
I-37057 San Giovanni Lupatoto (VR)

Negli ultimi anni i servizi fitosanitari delle province di Modena e Reggio Emilia hanno promosso iniziative di monitoraggio volte a comprendere la dinamica di diffusione dei giallumi della vite. Le analisi molecolari condotte sul materiale vegetale prelevato hanno permesso di stabilire che in queste province è presente Flavescenza dorata ("Flavescence Dorée": FD), ma la minaccia più grave alla viticoltura locale è rappresentata dal Legno nero ("Bois Noir": BN) che si sta diffondendo in modo epidemico (Bondavalli *et al.*, questo volume). Al fine di comprendere il quadro epidemiologico di questa malattia, alcuni dei vigneti più colpiti da BN nelle suddette province sono stati adottati come modello di studio. In collaborazione con i tecnici del servizio fitosanitario, in questi vigneti sono stati prelevati campioni vegetali (di vite e erbe spontanee) e sono state organizzate catture periodiche di *Hyalesthes obsoletus* Signoret, vettore della malattia e di *Reptalus panzeri* Löw, cixiide molto frequente nei vigneti colpiti da BN ma di cui non è stata ancora dimostrata la capacità di trasmettere il fitoplasma (Palermo *et al.*, 2004). Sul materiale raccolto è stata effettuata l'estrazione degli acidi nucleici (Prince *et al.*, 1993; Angelini *et al.*, 2001) e si è proseguito con diagnostica molecolare di routine (PCR-RFLP) applicata al gene codificante rRNA 16S.

(Lee *et al.*, 1998). L'uso di questo gene marcatore ha permesso di rintracciare il fitoplasma associato a BN in molti dei campioni prelevati da piante di vite (prevalentemente varietà di Lambrusco), erbacee (*Urtica dioica*, spesso asintomatica, *Convolvulus arvensis*, *Medicago sativa*, *Galium aparine* e *Plantago lanceolata*) ed insetti (*H. obsoletus* e *R. panzeri*) e di individuarne una isoforma molecolare in alcuni campioni di *R. panzeri*; tale "variante 16S" è stata sottoposta a clonaggio e sequenziamento e sembra al momento non avere una rilevante importanza epidemiologica dal momento che non è stata ritrovata in alcun campione vegetale né di vite né di erbe spontanee.

Il materiale vegetale ed entomologico risultato infetto dal fitoplasma associato a BN e dalla relativa variante molecolare è stato poi sottoposto a caratterizzazione molecolare utilizzando come marcatore il gene *tuf* codificante il fattore di allungamento della proteinosintesi EF-tu (Langer e Maixner, 2004). La tipizzazione molecolare basata su questo gene marcatore ha permesso di individuare tre varianti molecolari associate a BN: una individuata solo nei campioni di *R. panzeri* che avevano già mostrato variabilità sul gene 16S (variante D), una individuata in piante di vite, erbacee e in insetti (*H. obsoletus* e *R. panzeri*) (variante B) ed una terza (variante A) individuata in piante di vite ed in campioni di insetti (*H. obsoletus* e *R. panzeri*). A parte la variante D, individuata in *R. panzeri* ma in nessun campione vegetale, la variante A è risultata la più frequente in vite e in *H. obsoletus* nelle aree delle due province in cui il BN è in fase epidemica, ma non è mai stata ritrovata in erbe spontanee, neppure in piante di convolvolo e ortica che si suppone siano gli ospiti preferenziali del vettore noto della malattia. La variante B, riscontrata poco frequentemente in insetti e in piante di vite in aree di epidemia di BN, risulta comunque essere l'unica isoforma molecolare individuata su piante erbacee campionate nelle medesime aree.

Parole chiave: Legno Nero, Varianti molecolari, Epidemiologia, PCR, RFLP.

Summary

Molecular variability in 16SrXII phytoplasmas in Modena e Reggio Emilia provinces vineyards

In the last years in Modena and Reggio Emilia provinces surveys to monitor the spreading of grapevine yellows associated with phytoplasma infection were undertaken. Molecular analysis on the collected samples showed the presence of Flavescence dorée (FD) phytoplasmas, and let to understand that the major threat to these viticultural areas is Bois Noir (BN) that is spreading in an epidemic way (Bondavalli *et al.*, this book). To understand the epidemiological situation of this disease, some of the strongly BN infected vineyards have been taken as a model; plant samples (infected grapevine and weeds) and insects, *Hyalesthes obsoletus* Signoret, already known as BN vector, and *Reptalus panzeri* Löw known as a frequent species in vineyards, but not demonstrated to transmit BN phytoplasma, (Palermo *et al.*, 2004), were collected. Nucleic acids were extracted from these materials (Prince *et al.*, 1993; Angelini *et al.*, 2001) and DNA has been used for molecular detection assays (PCR-RFLP) on 16S rRNA gene (Lee *et al.*, 1998). The use of this gene let to identify BN phytoplasmas in many of the grapevine samples (Lambrusco variety), in weeds (*Urtica dioica*, often asymptomatic, *Convolvulus arvensis*, *Medicago sativa*, *Galium aparine* and *Plantago lanceolata*) and in insects (*H. obsoletus* and *R. panzeri*), and allowed to discriminate a molecular variant in some of the

R. panzeri samples; this “16S variant” has been cloned and sequenced, it seems not to have a relevant epidemiological importance since it has never been detected till now in grapevine or weed samples.

Samples infected by BN phytoplasmas and by the “16S variant” has been subjected to molecular characterization using *tuf* gene as a marker (Langer and Maixner, 2004). This further genetic characterization showed the presence of three variants associated to BN in the samples tested: the first (variant D) detected only in the *R. panzeri* samples infected by the “16S variant”, the second (variant B) detected in grapevine, weeds and insects (*H. obsoletus* and *R. panzeri*) and the third (variant A) detected only in grapevine and insects (*H. obsoletus* and *R. panzeri*). Except for variant D, that has been detected only in insects samples, variant A resulted as the most frequent in grapevine and *H. obsoletus* samples collected in BN epidemic areas, but it has never been found in weed samples, neither in nettle or bindweed, that have been reported to be the natural host plants of *H. obsoletus*. Variant B, detected less frequently in insects and grapevine in BN epidemic contexts, is the only variant found in weed samples in the same areas.

Key words: Bois Noir, Molecular variants, Epidemiology, PCR, RFLP.

Lavori citati

- ANGELINI E., D. CLAIR, M. BORGIO, A. BERTACCINI, E. BOUDON-PADIEU, 2001. Flavescente dorée in France and Italy. Occurrence of closely related phytoplasmas isolates and their near relationships to Palatinate grapevine yellows and an alder yellows phytoplasma. *Vitis*, **40** (2), 79-86.
- BONDAVALLI R., L. MILANESI, G. CAVALLINI, A. MONTERMINI, P. MAZIO, P. BORTOLOTTI, R. CREDI, V. VICCHI, A. BERTACCINI, 2005. Osservazioni epidemiologiche sui giallumi della vite nelle province di Modena e Reggio Emilia. Atti III Incontro Malattie da fitoplasmi, Milano 22-24 giugno 2005, questo volume.
- LEE I.-M., D.E. GUNDERSEN-RINDAL, R.E. DAVIS, I.M. BARTOSZYK, 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.
- 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** (4), 191-199.
- PRINCE J.P., R.E. DAVIS, T.K. WOLF, I.-M. LEE, B.D. MOGEN, E.L. DALLY, A. BERTACCINI, R. CREDI, M. BARBA, 1993. Molecular detection of diverse mycoplasma-like organisms (MLOs) associated with grapevine yellows and their classification with aster yellows, X-disease, and elm yellows MLOs. *Phytopathology*, **83**, 1130-1137.

PALERMO S., M. ELEKES, S. BOTTI, I. EMBER, A. ALMA, A. OROSZ, A. BERTACCINI, M. KÖLBER, 2004. Presence of Stolbur phytoplasma in Cixiidae from Hungarian grapevine growing areas. *Vitis*, **43(4)**, 201-203.

Lavoro svolto nell'ambito del progetto CRPV Emilia-Romagna: Studio sui giallumi da fitoplasma della vite.

Autore di riferimento: Dott.ssa Simona Botti Tel. 051-2096723/55; Fax: 051-2096723