

Atti del “Workshop”:
3° Incontro Nazionale
sulle Malattie da Fitoplasmi

*Proceedings of the Workshop:
3th National meeting
on phytoplasma diseases*

Milano
22-23 giugno 2005 June 22-23, 2005
Italy

Comitato Scientifico/*Scientific Committee*

Alberto **Alma**
Marina **Barba**
Assunta **Bertaccini**
Pietro A. **Bianco**
Maurizio **Conti**
Ruggero **Osler**
Antonio **Ragozzino**

Comitato organizzatore/*Organizing Committee*

Giuseppe **Belli**
Piero A. **Bianco**
Paola **Casati**
Stafania **Prati**
Fabio **Quaglino**
Anna **Zorloni**

Istituto di Patologia Vegetale

Università degli Studi

Via Celoria, 2, I-20133 Milano
Tel. 02.50316794 - Fax 0250316781
e-mail: piero.bianco@unimi.it

Presentazione

Le malattie dei fitoplasmi per la loro importanza richiamano sempre più l'attenzione degli "addetti ai lavori" e, in alcuni casi, dei semplici cittadini interessati, spesso, dall'impatto che alcune fitoplasmosi, come la Flavescenza dorata della vite e degli Scopazzi del melo, hanno avuto, ed hanno ancora, su estese aree del nostro Paese.

Da anni, fitoplasmologi ed entomologi si impegnano per diffondere le acquisizioni scientifiche e fornire, a tecnici ed operatori, le conoscenze necessarie per la prevenzione ed il controllo delle malattie causate da questi patogeni. Infatti, dalla prima edizione dell'Incontro Nazionale sulle malattie da fitoplasmi, tenutosi a Udine nel 1999 sono state sviluppate iniziative come la costituzione di un Gruppo di Lavoro "Malattie dei Fitoplasmi" nato in seno alla S.I.Pa.V. (Società Italiana di Patologia Vegetale) e l'avvio di Progetti Nazionali come il progetto del Ministero delle Politiche Agricole sui giallumi della vite (GIAVI).

La validità di tali iniziative ha attirato l'interesse di ricercatori e tecnici di discipline e nazionalità diverse, alcuni dei quali hanno partecipato ai lavori del III Incontro, tenutosi a Milano nel giugno scorso.

Gli atti raccolti in questo volume testimoniano l'ampiezza dei temi trattati e la qualità dei contributi forniti da più di 100 ricercatori (fitopatologi, entomologi, fisiologi vegetali e genetisti agrari) i quali hanno discusso approfonditamente sull'eziologia, l'epidemiologia, la diagnosi ed il controllo delle malattie da fitoplasmi.

Certi del valore e dell'originalità di tali contributi, presentiamo la pubblicazione di questi Atti con l'auspicio che possano servire da supporto conoscitivo per coloro che a vario titolo sono chiamati ad operare per contrastare i gravi effetti che ogni anno le malattie da fitoplasmi causano in Italia e nel mondo.

PROGRAMMA

Mercoledì 22 giugno

- 13.30 Registrazione partecipanti e affissione posters
- 14.00 Saluto ai Congressisti e apertura dei lavori
- 14.30 Relazione su invito: “**Ecological implications from molecular analysis of phytoplasmas involved in two epidemics in the U S**”
Ing-Ming Lee (Molecular Plant Pathology Laboratory, USDA, Beltsville)
- 16.00 Pausa caffè

NUOVE SEGNALAZIONI

- 16.30 **La fillosia del cotone nella regione di Bougouni (Mali)**
D. Bosco, T. De Gregorio, A. Alma, A. Coulibaly, N tô Coulibaly,
C. Marzachi
- 16.45 **Individuazione di *Candidatus Phytoplasma ziziphi* in drupacee in Italia**
S. Paltrinieri, S. Botti, F. Dal Molin, A. Bertaccini
- 17.00 **Una grave epidemia di stolbur su sedano in Friuli Venezia Giulia**
F. Ferrini, L. Carraro, M. Babici, N. Loi
- 17.15 **Associazione del fitoplasma dello stolbur (16SrXII-A) ad un giallume della fragola in Emilia-Romagna**
R. Credi, F. Terlizzi, A.R. Babini
- 17.30 **Infezioni da fitoplasmi in *Hyssopus officinalis* L. - Analisi dell'olio essenziale**
A. Bertaccini, P. Vallesi, R. Gotti, A. Benni, M.G. Bellardi
- 17.45 ***Myrtus communis* L. nuovo ospite di fitoplasmi in Sardegna**
R. Garau, V.A. Prota, S. Paltrinieri, A. Sechi, G. Tolu, A. Bertaccini
- 18.00-18.30 Discussione

Giovedì 23 giugno

VETTORI

- 8.30 **Indagine su possibili vettori di apple proliferation in Trentino**
L. Mattedi, F. Forno, C. Cainelli, M. S. Grando, P. Bragagna,
M. Filippi, M. Deromedi
- 8.45 **Identificazione di *Cacopsylla picta* (syn. *Cacopsylla costalis*) come vettore del fitoplasma apple proliferation in Germania**
B. Jarausch-Wehrheim, N. Schwind, W. Jarausch, T. Peccerella, G. Krczal

- 9.00 **Ruolo della psillidofauna del biancospino in relazione alla malattia degli scopazzi del melo**
R. Tedeschi, L. Bertignono, A. Alma
- 9.15 **Dispersione ed attività di volo giornaliera di *Scaphoideus titanus* Ball (*Homoptera Cicadellidae*)**
F. Lessio, Z. Balasz, A. Alma
- 9.30 **Indagine preliminare sugli auchenorrhinchi potenziali vettori di stolbur in un'area viticola del Lazio**
B. Bagnoli, F. Pinzauti, V. Trivellone
- 9.45 **Osservazioni sul vettore del fitoplasma del legno nero della vite, *Hyalesthes obsoletus*, in Emilia-Romagna**
L. Milanese, R. Bondavalli, N. Mori, D. Dradi, I. Menozzi, A. Bertaccini
- 10.00-10.30 Discussione
- 10.30 -11.00 Pausa caffè

EPIDEMIOLOGIA

- 11.00 **Studi epidemiologici sul giallume europeo delle drupacee (ESFY) in impianti peschicoli del veronese**
N. Mori, L. Giunchedi, D. Panato, D. Pignatta, C. Poggi Pollini, T. Visigalli
- 11.15 **Struttura e dinamica della popolazione di apple proliferation in Trentino**
C. Cainelli, M. S. Grando
- 11.30 **Osservazioni epidemiologiche sui giallumi della vite nelle province di Modena e Reggio Emilia**
R. Bondavalli, L. Milanese, G. Cavallini, A. Montermini, P. Mazio, P. Bortolotti, R. Credi, V. Vicchi, A. Bertaccini
- 11.45 **Presenza di fitoplasmi nella flora spontanea dei vigneti**
L. Filippin, E. Angelini, G. Lucchetta, L. Leandrin, M. Borgo
- 12.00 **Secondo rinvenimento di flavescenza dorata della vite nelle Marche**
G. Romanazzi, S. Murolo, F. Terlizzi, S. Talevi, B.M. Branzanti, S. Nardi, R. Credi, V. Savino
- 12.15-12.30 Discussione
- 12.30-14.00 Pranzo

DIAGNOSI

- 14.00 **Utilizzo della Real Time PCR per la valutazione del fitoplasma del giallume europeo delle drupacee (ESFYP) nel materiale vivaistico**
D. Pignatta, F. Forno, L. Giunchedi, M. Gobber, L. Mattedi,
P. Miorelli, C. Poggi Pollini, C. Ratti, E. Ropelato
- 14.15 **Diagnosi universale e specifica di fitoplasmi in vite, melo ed insetti vettori mediante Real Time PCR**
L. Galetto, D. Bosco, R. Tedeschi, C. Marzachì
- 14.30 **Sonde a nanobiotrasduttori per la diagnosi del fitoplasma agente della flavescenza dorata**
M. Moretti, G. Firrao
- 14.45 **Sviluppo di nuovi metodi Real Time PCR per l'identificazione della flavescenza dorata associata ai giallumi della vite**
E. Angelini, G. Bianchi, C. Morassutti, L. Filippin, M. Borgo
- 15.00 **Perché è così difficile osservare al microscopio elettronico i fitoplasmi della vite?**
F. Faoro
- 15.15-15.45 Discussione
- 15.45-16.15 Pausa caffè

CARATTERIZZAZIONE

- 16.15 **Diffusione e caratterizzazione di sottotipi di “*Candidatus Phytoplasma mali*” in diverse zone vocate alla melicoltura**
M. Martini, P. Ermacora, D. Delić, Moruzzi, N. Loi, L. Carraro
- 16.30 **Individuazione e caratterizzazione di fitoplasmi della vite in Calabria**
G. Albanese, G. Pasquini, R. Sciarroni, L. Ferretti, R. La Rosa
- 16.45 **Caratterizzazione di fitoplasmi associati al legno nero (LN) della vite in Liguria, Piemonte, Sardegna, Sicilia e Valle d'Aosta**
D. Pacifico, A. Alma, M. Tessitori, R. Tedeschi, C. Marzachì
- 17.00 **Caratterizzazione molecolare di isolati di legno nero nell'Italia centrale e meridionale**
G. Pasquini, L. Ferretti, G. Albanese, M. Barba
- 17.15 **Variabilità molecolare di fitoplasmi 16SrXII in vigneti delle province di Modena e Reggio Emilia**
S. Botti, S. Paltrinieri, N. Mori, L. Milanesi, R. Bondavalli,
A. Bertaccini
- 17.30 - 18.00 Discussione

Venerdì 24 giugno

PREVENZIONE E CONTROLLO

- 9.00 **Individuazione di marker cDNA-AFLP in portainnesti di melo resistenti ad apple proliferation (AP)**
M. Moser, W. Jarausch, E. Seemüller, R. Velasco
- 9.15 **Controllo di apple proliferation - Scopazzi del melo mediante l'impiego di portainnesti resistenti**
W. Jarausch, C. Bisognin, T. Peccerella, E. Seemüller
- 9.30 **Attività di alcuni insetticidi nella prevenzione della trasmissione del fitoplasma *chrysanthemum yellows* (CY; 16Sr-IB)**
P. Saracco, C. Marzachi, D. Bosco
- 9.45 **Prove di contenimento del legno nero della vite**
N. Mori, L. Milanesi, R. Bondavalli, S. Botti
- 10.00 **Funghi endofiti della vite con possibile implicazione nel recovery da flavescenza dorata**
R. Musetti, M. Martini, S. Borselli, R. Osler
- 10.15 **Individuazione e localizzazione di un simbiote "Candidatus *Cardinium* sp." in organi e tessuti di *Scaphoideus titanus*, insetto vettore della Flavescenza dorata in *Vitis vinifera***
M. Pajoro, M. Marzorati, A. Alma, L. Sacchi, S. Palermo,
R. Tedeschi, L. Brusetti, N. Raddadi, F. Quaglino, P. A. Bianco,
C. Bandi, D. Daffonchio
- 10.30-11.00 Discussione sessione
- 11.00-12.00 Discussione finale e chiusura dei lavori

POSTER

- 1 **I giallumi della vite: un fattore limitante le produzioni vitivinicole. Rilevamento di auchenorrhinchi vettori accertati e potenziali di fitoplasmi**
A. Alma, F. Lessio, F. Pavan, V. Forte, E. Angelini, M. Borgo, B. Bagnoli, F. Pinzauti, V. Trivellone
- 2 **Identificazione stagionale e caratterizzazione dei fitoplasmi associati ai giallumi della vite**
E. Angelini, L. Filippin, C. Michelini, M. Borgo
- 3 **Dinamica di colonizzazione stagionale del fitoplasma apple proliferation in relazione ad alcuni parametri fisiologici nelle piante**
P.L. Bianchedi, A.M. Ciccotti, F. Pedrazzoli, R. Zorer
- 4 **Monitoraggio dei giallumi della vite e caratterizzazione dei fitoplasmi nell'ambito del progetto finalizzato "GIA.VI" nel 2004**
M. Borgo, E. Angelini, L. Filippin, S. Botti, C. Marzachì, P. Casati, F. Quaglino, A. Zorloni, G. Albanese, R. La Rosa, G. Pasquini, A. Bertaccini
- 5 **Identificazione di fitoplasmi riscontrati in viti affette da giallumi nell'ambito dei controlli effettuati in Regione Lombardia dal Servizio Fitosanitario nell'anno 2004**
M. Calvi, B. Lavagna, M. Celè
- 6 **Trasmissione di apple proliferation tramite anastomosi radicali**
A. M. Ciccotti, P.L. Bianchedi, P. Bragagna, M. Deromedi, M. Filippi, F. Forno, L. Mattedi
- 7 **Monitoraggio dei giallumi della vite in Abruzzo**
D. D'Ascenzo, S. Murolo, R. Di Giovanni, B. M. Branzanti, G. Romanazzi
- 8 **Indagine epidemiologica in un vigneto affetto da "legno nero" nel nord-Sardegna**
R. Garau, V.A. Prota, A. Sechi, A. Lentini, S. Botti, G. Tolu, A. Bertaccini
- 9 **Indagini sulla presenza della flavescenza dorata della vite e di *Scaphoideus titanus* in Basilicata**
C. Marcone, I. Camele, V. Castoro, R. Spicciarelli
- 10 **Monitoraggio dei vettori dei fitoplasmi della vite in Lombardia ed Emilia Romagna (Italia settentrionale)**
E. Mazzoni, P. Cravedi, R. Nicoli Aldini, F. Pavese
- 11 **Diffusione del legno nero nelle principali aree viticole del Lazio**
G. Pasquini, L. Ferretti, V. Lumia, R. Sciarroni
- 12 **Gravi deperimenti associati al giallume europeo delle drupacee (european stone fruit yellow ESFY) in un impianto biologico nel Lazio**
G. Pasquini, V. Lumia, L. Ferretti

- 13 **Possibile trasmissione di fitoplasmi 16SrX-B mediante *Empoasca decedens* P. ed *Empoasca* spp. a *Prunus domestica* L. ed a *Prunus salicina* Lindl**
M. Pastore, S. Paltrinieri, M. Petriccione, R. Priore, A. Bertaccini
- 14 **Strategie di controllo della flavescenza dorata della vite**
F. Pavan, C. Bellomo, L. Carraro, P. Ermacora, M. Martini, A. Loschi, R. Osler, P.A. Bianco, G. Belli, A. Zorloni, P. Casati, F. Quaglino, M. Borgo, E. Angelini
- 15 **Indagini sulla presenza del giallume europeo delle drupacee (ESFY) e di altri fitoplasmi in piante spontanee in provincia di Trento**
C. Poggi Pollini, L. Giunchedi, M. Gobber, P. Miorelli, D. Pignatta, F. Terlizzi
- 16 **Microflora batterica endofita in viti affette da flavescenza dorata (FD) e soggette a "recovery"**
F. Quaglino, P. Casati, M. Marzorati, L. Brusetti, R. Tedeschi, D. Daffonchio, A. Alma, P.A. Bianco
- 17 **Variabilità genetica di fitoplasmi appartenenti alla specie "*Candidatus Phytoplasma ulmi*" riscontrati in un olmo (*Ulmus minor*) secolare**
F. Quaglino, P. Casati, T. Eccher, P.A. Bianco
- 18 **Presenza di differenti isolati di "*Candidatus Phytoplasma solani*" associati al legno nero (LN) della vite in Lombardia, Toscana e Marche**
F. Quaglino, A. Zorloni, P. Casati, P.A. Bianco, G. Belli
- 19 **Prove di multiplex Real-Time PCR per la diagnosi dei fitoplasmi del legno nero e della flavescenza dorata della vite**
F. Terlizzi, A.R. Babini, C. Ratti, R. Credi
- 20 **Diagnostics of ESFY in symptomless apricot trees - disagreement between molecular and biological assays**
J. Salava, J. Polák, M. Bryxiová, J. Svoboda

**ECOLOGICAL IMPLICATIONS FROM A MOLECULAR
ANALYSIS OF PHYTOPLASMAS INVOLVED IN TWO
EPIDEMICS IN THE US**

Ing-Ming Lee

Molecular Plant Pathology Laboratory - Plant Sciences Institute
USDA, ARS Beltsville, MD 20705 U.S.A.

Nested PCR assays using 16S rDNA- and ribosomal protein (rp) gene sequence-based primers and RFLP analysis of PCR amplicons were employed for the investigation of an aster yellows (AY) epidemic in Texas (Winter Garden region) in early spring of 2000 and potato purple top (PPT) and related epidemics, dry bean phyllody (DBPh) and carrot purple leaf (CPL), during late summer and fall of 2000-2002 in Washington (Columbia Basin region). The results revealed that the AY epidemic involved carrot and several other crops (onion, parsley, cabbage, and dill) and weeds. At least three leafhopper species (*Macrostelus fascifrons*, *Scaphytopius irroratus*, and *Ceratagalia abrupta*) were potential vectors that contributed the epidemic. Phytoplasmas belonging to two subgroups, 16SrI-A and 16SrI-B, in the AY group (16SrI) were detected in the infected plants. Carrot, parsley, and dill were infected with both subgroups. Onion and three weeds (prickly lettuce, lazy daizy, and false ragweed) were predominantly or exclusively infected by subgroup 16SrI-A phytoplasma strains, while cabbage was infected by subgroup 16SrI-B phytoplasmas. Both types of phytoplasmas were detected in all three leafhopper species. Mixed infections were very common in individual carrot, parsley, and dill plants and in individual leafhoppers. Phylogenetic analysis suggested that the phytoplasmas came from the same pool. The different phytoplasma population profiles present in various crops may be attributed to the ecological constraints as a result of the vector-phytoplasma-plant three way interaction. In contrast, beet leafhopper, *Circulifer tenellus*, is the predominant or the sole vector that contributed the PPT and related epidemics in Washington. Phytoplasmas belonging to subgroup 16SrVI-A (rpVI-B) in the clover proliferation group (16SrVI) were detected in PPT, DBPh and CPL infected plants. However, subgroup 16SrI-A phytoplasmas and *Spiroplasma citri* were also detected in CPL infected plants. *S. citri* was the predominant pathogen associated with CPL. Hypothetical ecological models of phytoplasmas and *S. citri* for the epidemics were proposed.

NUOVE SEGNALAZIONI

La fillodia del cotone nella regione di Bougouni (Mali)	
D. Bosco, T. De Gregorio, A. Alma, A. Coulibaly, N'tô Coulibaly, C. Marzachi	15
Individuazione di <i>Candidatus Phytoplasma ziziphi</i> in drupacee in Italia	
S. Paltrinieri, S. Botti, F. Dal Molin, A. Bertaccini	19
Una grave epidemia di stolbur su sedano in Friuli Venezia Giulia	
F. Ferrini, L. Carraro, M. Babici, N. Loi	23
Associazione del fitoplasma dello stolbur (16SrXII-A) ad un giallume della fragola in Emilia-Romagna	
R. Credi, F. Terlizzi, A.R. Babini	27
Infezioni da fitoplasmi in <i>Hyssopus officinalis</i> L. - Analisi dell'olio essenziale	
A. Bertaccini, P. Vallesi, R. Gotti, A. Benni, M.G. Bellardi	31
<i>Myrtus communis</i> L. nuovo ospite di fitoplasmi in Sardegna	
R. Garau, V.A. Prota, S. Paltrinieri, A. Sechi, G. Tolu, A. Bertaccini	33

**LA FILLODIA DEL COTONE
NELLA REGIONE DI BOUGOUNI (MALI)**

**D. Bosco¹, T. De Gregorio¹, A. Alma¹, A. Coulibaly²,
N'tô Coulibaly², C. Marzachi³**

¹Di.Va.P.R.A. Entomologia e Zoologia applicate all'Ambiente "Carlo Vidano",
Università di Torino, Via L. da Vinci 44,
I-10095 Grugliasco (TO)

²Institut Polytechnique Rural, Université du Mali, Katibougou, Koulikoro, Mali

³Istituto di Virologia Vegetale, CNR,
Strada delle Cacce, 73, I-10135 Torino

Nell'ambito della cooperazione decentrata sostenuta dalla Regione Piemonte è attiva da alcuni anni una cooperazione interuniversitaria Torino-Sahel. Il Centro Interdipartimentale per gli Studi e le Ricerche sull'Africa Occidentale (CISAO) è stato creato per riunire i ricercatori di diverse discipline impegnati in questa cooperazione. Il cotone, *Gossypium hirsutum* L., è la principale coltura da reddito del Mali, che rappresenta il secondo esportatore tra i paesi africani. Una malattia associata a fitoplasmi, la fillodia, è stata segnalata per la prima volta nel 1965 da Delattre nell'Alto Volta, l'attuale Burkina Faso. Durante sopralluoghi in campo nel 2003 nella regione cotoniera di Bougouni, Mali del Sud, in campi di cotone biologico e convenzionale sono stati osservati ripetutamente sintomi di fillodia. La malattia appariva diffusa in tutto l'areale indagato con un basso livello di infezione, tuttavia presso Yanfolila la fillodia coinvolgeva fino al 50% delle piante in coltivazioni biologiche. Ricerche sono state intraprese per chiarire l'eziologia e l'epidemiologia di questa pericolosa fitoplasmosi.

Campioni di piante sintomatiche sono stati raccolti nel 2003 e 2004 presso Yanfolila, Kolondjeba e Bougouni, località distanti fra loro fino a 180 Km e sottoposti ad estrazione del DNA totale ed analisi mediante PCR. Durante i mesi di agosto e settembre del 2004 campionamenti di cicaline potenziali vettrici sono stati condotti in diversi campi di Kolondjeba e Yanfolila mediante retino entomologico e trappole adesive gialle. Le cicaline catturate con retino sono state conservate in alcool sia per l'estrazione del DNA totale e le analisi di PCR sia per l'identificazione specifica.

I campioni di cotone con sintomi hanno prodotto un amplicone fitoplasma-specifico, generalmente in PCR diretta, con diverse coppie di inneschi universali. L'analisi di restrizione ha evidenziato in tutti i campioni lo stesso profilo, corrispondente all'isolato di riferimento faba bean phyllody, appartenente al sottogruppo tassonomico 16Sr-IIC. I nostri risultati indicano quindi che in Mali la fillodia del cotone è associata a fitoplasmi simili a quelli identificati in cotone

coltivato in Burkina Faso (Schneider *et al.*, 1997). Delle cicaline catturate mediante retino, circa 170 individui, suddivisi in una dozzina di specie, appartenevano alla sottofamiglia Deltocephalinae (famiglia Cicadellidae), che annovera i vettori di fitoplasmi. L'identificazione specifica è in corso. Da 5 individui sono stati ottenuti ampliconi fitoplasma-specifici. Due individui, appartenenti alla specie *Orosius lotophagorum* (Kirkaldy) hanno prodotto un amplicone di intensità troppo debole per permettere la successiva caratterizzazione mediante RFLP. Tre individui di un'altra specie, non ancora identificata, hanno prodotto un amplicone con profilo di restrizione diverso da quello del cotone. Finora quindi non è stata identificata la specie vettrice in Mali, mentre in Burkina Faso è stato dimostrato il ruolo di *O. cellulosus* (Lindberg) nella trasmissione della fillodia tra piante di cotone e tra *Sida* sp., Malvacea spontanea, e cotone (Laboucheix *et al.*, 1973).

Parole chiave: Cotone, Fitoplasma, *Orosius*.

Summary

Cotton phyllody in the region of Bougouni (Mali)

A cooperation is currently ongoing among Universities in Torino and in the Sahel, in the frame of a cooperation project funded by the Piemonte Region. The Centro Interdipartimentale per gli Studi e le Ricerche sull'Africa Occidentale (CISAO) is a facility created for researchers in different fields working in the frame of this cooperation project. Cotton, *Gossypium hirsutum* L., is the most economically important crop in Mali, which is the second exporter in Africa. A phytoplasma-associated disease, cotton phyllody, has been reported for the first time by Delattre in Haute Volta, today Burkina Faso. Phyllody symptoms were observed in 2003 during field surveys in the cotton-growing region of Bougouni, South Mali. The disease was present, with low incidence, in all the surveyed area but, in the area next to Yanfolila, up to 50% of the plants grown in organic plantations were showing phyllody. Aetiology and epidemiology of this dangerous phytoplasma-associated disease were then studied.

Total DNA was extracted from samples of symptomatic plants collected in 2003 and 2004 around Yanfolila, Kolondjeba and Bougouni, in areas that were about 180 Km away from each other, and analysed by phytoplasma-specific PCR. In August and September 2004 potential leafhopper vectors were sweep-collected in different fields next Kolondjeba and Yanfolila. Yellow sticky traps were also used for insect collection. Sweep-captured leafhoppers were stored under ethanol for later DNA extraction and PCR analysis or species identification.

All symptomatic cotton samples produced a phytoplasma-specific

amplicon, most of them in direct PCR assays driven with different universal primer pairs. RFLP analysis has shown that all amplicons shared the same profile, identical to that of the faba bean phyllody (16Sr-IIC) reference isolate. Our results therefore indicate that cotton phyllody in Mali is associated with phytoplasmas similar to those identified in cotton plants from Burkina Faso (Schneider *et al.*, 1997). Among the sweep-collected leafhoppers, 170 specimen belonged to about 12 species in the subfamily Deltocephalinae (family Cicadellidae), which includes all known phytoplasma vectors. Species identification is in progress. Phytoplasma-specific amplicons have been obtained from total DNA of 5 leafhoppers. The amplicons produced by 2 individuals, belonging to the species *Orosius lotophagorum* (Kirkaldy), were not enough to allow successive characterization by RFLP. Amplicons obtained from 3 leafhoppers belonging to one single species not yet identified, showed identical RFLP profiles different from that obtained by symptomatic cotton samples. Therefore the vector species of cotton phyllody in Mali has not yet been identified, while, in Burkina Faso, the role of *O. cellulosus* (Lindberg) in vectoring the disease between cotton plants or between *Sida* sp., a wild Malvacea, and cotton has been proved (Laboucheix *et al.*, 1973).

Key words: Cotton, Phytoplasma, *Orosius*.

Lavori citati

- DELATTRE R., 1968. *Coton et Fibres Tropicales*, **20** (2) 289-294.
- LABOUCHEIX J., A.L. OFFEREN, M. VAN DESMIDTS, 1973. *Coton et Fibres Tropicales*, **28** (4), 461-471.
- SCHNEIDER B., C. MARCONE, M. KAMPMANN, A. RAGAZZINO, W. LEDERER, M.-T. COUSIN, E. SEEMÜLLER, 1997. *European Journal of Plant Pathology*, **103**, 675-686.

INDIVIDUAZIONE DI *CANDIDATUS PHYTOPLASMA ZIZIPHI* IN DRUPACEE IN ITALIA

**S. Paltrinieri¹, S. Botti¹,
F. Dal Molin², A. Bertaccini¹**

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

²Servizio Fitosanitario Regionale Veneto,
Viale dell'Agricoltura, 1A, I-37060 Buttapietra (VR)

In due diversi areali dell'Italia settentrionale, particolarmente vocati alla coltivazione di piante di pesco e di ciliegio, è stato osservato negli ultimi anni un quadro sintomatologico particolarmente grave che si conclude con la morte delle piante nell'arco di un paio di settimane, un mese al massimo, dalla comparsa dei primi sintomi. Fin dall'inizio dell'estate sulle piante colpite è evidente la presenza di foglie piccole, clorotiche, arrossate che tendono ad accartocciarsi e a cadere prematuramente, inoltre la lignificazione dei giovani rami appare incompleta.

Avendo escluso con indagini preliminari la presenza di agenti biotici ed abiotici diversi, allo scopo di verificare l'eventuale presenza di fitoplasmi si è effettuata l'estrazione dell'acido nucleico dalle nervature fogliari e dal tessuto floematico di piante deperienti. Si è utilizzato un metodo basato su estrazione con cloroformio/fenolo (Prince *et al.*, 1993); successivamente si è proceduto con analisi molecolari (PCR), utilizzando oligonucleotidi che amplificano il gene 16S rDNA, la regione spaziatrice e parte del gene 23S in nested PCR.

I campioni risultati positivi con i "primers" R16F2/R2 sono stati sottoposti ad analisi RFLP, utilizzando specifici enzimi di restrizione, quali *MseI*, *RsaI* e *HpaII* (Lee *et al.*, 1998), che hanno permesso di osservare l'uguaglianza tra i profili generati dai frammenti amplificati dai campioni di pesco e di ciliegio e la loro corrispondenza al campione di controllo JWB ("Jujube witches'-broom"), permettendo in tal modo di attribuire i fitoplasmi individuati al sottogruppo 16SrV-B.

Successivamente, utilizzando le precedenti informazioni relative ai fitoplasmi individuati, sono stati impiegati gli oligonucleotidi CJF1/R1 (Zhu *et al.*, 1997) specifici per questo sottogruppo ribosomico, riuscendo in tal modo a confermare la classificazione preliminare.

Al medesimo risultato si è arrivati anche ricorrendo al sequenziamento dei frammenti di acido nucleico ottenuti dall'amplificazione con i "primers" R16F2/R2 di un campione di pesco e di uno di ciliegio. L'allineamento con le sequenze genomiche depositate in GenBank ha infatti consentito di individuare una percentuale di omologia del 99% con la sequenza AB052877 (*Candidatus Phytoplasma ziziphi*) recentemente descritto (Jung *et al.*, 2003).

Dalla bibliografia è nota da tempo la presenza, nei principali areali di coltivazione di pesco e di ciliegio, di fitoplasmi molto gravi ed associati a diversi agenti quali: 16SRX-B in Europa, 16SRIII-A in Canada e California, 6SRVII-A in Sicilia, 16SRV-B in India e Cina, 16SRXII-A in Italia e Cile. La presenza del fitoplasma responsabile dello scopazzo del giuggiolo, risulta essere comunque individuata per la prima volta in Italia; ciò rende il ritrovamento particolarmente importante e preoccupante e sarà importante, quindi, effettuare ulteriori indagini sul territorio nazionale allo scopo di verificare la reale diffusione di questo fitoplasma nelle nostre coltivazioni.

Parole chiave: Fitoplasmi, Pesco, Ciliegio, PCR/RFLP, Sequenziamento.

Summary

During the last years in two different areas of northern Italy in which cherry and peach trees are mainly grown it was observed a severe symptomatology that leads plants to decline and die in two-weeks/one month maximum. From the beginning of the summer the affected plants show leaves of smaller size, with chlorosis, reddening, curling aspect, and premature fall; young branches also show some lack of lignifications. Preliminary tests allow to exclude the presence of several biotic or abiotic agents therefore to verify the possible phytoplasma association with the disease, nucleic acid extraction was performed from leaf midribs as well as from phloem scrapes of declining trees. Chloroform/phenol extraction (Prince *et al.*, 1993) was applied before molecular analyses that were then carried out by nested PCR with primers amplifying 16S rDNA, spacer region and part of the 23S region. Samples positive with R16RF2/R2 primers were subjected to RFLP analyses with *Mse*I, *Rsa*I, and *Hpa*II (Lee *et al.*, 1998), restriction profiles obtained from peach and cherry samples were undistinguishable from each others and were identical to the reference sample JWB (jujube witches'-broom) employed as control, therefore the phytoplasmas detected were attributed to ribosomal subgroup 16SrV-B. The further use of CJF1/R1 (Zhu *et al.*, 1977) subgroup 16SrV-B specific primers allow to confirm this identification. Sequencing of R16F2/R2 amplicons obtained from one sample of peach and one of cherry respectively was also performed. After aligning and comparing these sequences with those in GenBank it was possible to determine the presence of 99% homology with sequence AB052877, *Candidatus* Phytoplasma ziziphi recently described (Jung *et al.*, 2003).

It is known from literature that in areas where peach and cherry are mainly cultivated severe phytoplasma diseases often occur, but they are associated with diverse agents: 16SrX-B in Europe, 16SrIII-A in Canada and California, 16rVII-A in Sicily, 16SrV-B in India and China, 16SrXII-A in

Italy and Chile. The detection of jujube witches'-broom subgroup phytoplasmas is however reported for the first time in Italy and this must to be taken into consideration for possible epidemic outbreaks. It is important to continue the monitoring at national level in order to verify the real diffusion and spreading of this phytoplasma in Italian cultivations.

Key words: Phytoplasmas, Peach, Cherry, PCR/RFLP, Sequencing.

Lavori citati

- JUNG H.Y., T. SAWAYANAGI, H. KAKIZAWA, W. WEI, K. OSHIMA, S. MIYATA, M. UGAKI, T. HIBI, S. NAMBA, 2003. "Candidatus phytoplasma ziziphi", a novel phytoplasma taxon associated with jujube witches'-broom disease. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **53**, 1037-1041.
- 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.
- 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.
- ZHU S.F., A. HADIDI, I.-M. LEE, D.E. GUNDERSEN-RINDAL, C.L. ZHANG, 1997. Characterization of the phytoplasmas associated with cherry lethal yellows and jujube witches'-broom diseases in China. *Acta Horticulturae*, **472**, 701-714.

Ringraziamenti

Si ringrazia il Dr. N. Mori di Agrea, Verona per aver fornito parte del materiale utilizzato nella sperimentazione..

Autore di riferimento: Dr. Samanta Paltrinieri - e-mail: Bertaccini_A@biblio.cib.unibo.it

UNA GRAVE EPIDEMIA DI STOLBUR SU SEDANO IN FRIULI VENEZIA GIULIA

F. Ferrini¹, L. Carraro¹, M. Babici², N. Loi¹

¹Dipartimento di Biologia Applicata alla Difesa delle Piante,
Università di Udine, Via delle Scienze, 208, I-33100 Udine

²Servizio Fitosanitario Regione Friuli Venezia Giulia,
Ufficio periferico di Trieste, Viale Miramare 9, I-34100 Trieste

Molte piante arboree, arbustive ed erbacee sono note quali ospiti naturali di fitoplasmi appartenenti al gruppo Stolbur (16SrXII). Tra queste sono da ricordare alcune piante orticole largamente coltivate (Marzachi *et al.*, 2000).

A partire dal 2002 è stato condotto uno studio sull'epidemiologia dello Stolbur sul sedano nella regione Friuli Venezia Giulia (Italia). La malattia, già segnalata in passato nel territorio (Osler *et al.*, 1996), ha assunto un andamento altamente epidemico in alcune aziende orticole della provincia di Trieste. Gli aspetti studiati, oltre all'identificazione del patogeno, sono stati: 1) l'incidenza della malattia in rapporto al periodo di trapianto del sedano in pieno campo (precoce o tardivo); 2) la presenza del patogeno su altre colture orticole; 3) la presenza di piante ospiti spontanee; 4) la ricerca del vettore o dei vettori del fitoplasma.

I risultati ottenuti hanno evidenziato un'alta incidenza della malattia (80%) soprattutto quando la coltura è anticipata, in seguito a trapianti effettuati ad inizio giugno. Oltre al sedano, altre piante orticole - lattuga, carota, prezzemolo e pomodoro - sono risultate ospiti del fitoplasma ma solo su pomodoro è stata osservata un'incidenza di una certa importanza (5%). Fra le piante spontanee, oltre che su *Mercurialis annua* e *Cirsium* sp., la presenza del fitoplasma è stata riscontrata su molte piante di *Convolvulus arvensis*. Tale specie appare quindi fondamentale nel ciclo epidemico della malattia sia per la diffusione (sorgente d'infezione) che per lo svernamento del patogeno. Le ricerche sul vettore del fitoplasma hanno permesso di confermare il ruolo assunto da *Hyalesthes obsoletus* (Maixner *et al.*, 1995) nell'epidemiologia dello Stolbur. Alle analisi molecolari condotte su insetti catturati in campo, *H. obsoletus* è risultato altamente infetto (45%). Anche mediante prove di trasmissione su piante test di sedano è stata dimostrata la capacità di *H. obsoletus* di trasmettere il fitoplasma.

Gli studi proseguiranno sia per ricercare altre piante coltivate e spontanee ospiti del fitoplasma sia per identificare altri possibili insetti vettori.

Parole chiave: Fitoplasma, Stolbur, Sedano, *Hyalesthes obsoletus*.

Summary

A serious epidemic of stolbur on celery in Friuli Venezia Giulia

Many arboreal, shrubby and herbaceous plants are natural hosts of phytoplasmas belonging to the Stolbur group (16SrXII). Among these some widely cultivated horticultural crops should be remembered (Marzachi *et al.*, 2000).

Since 2002, a study has been carried out on the presence and the epidemiology of Stolbur on celery in the Friuli Venezia Giulia Region (Italy). The disease, already noted in the territory (Osler *et al.*, 1996), has assumed high epidemic levels in some horticultural farms in the Trieste province. The aspects considered, besides the identification of the pathogen, are: 1) incidence of the disease in relation to the period when celery is transplanted in the field (early or late); 2) presence of the pathogen on other horticultural crops; 3) presence of spontaneous host plants; 4) search for the vector/s of the phytoplasma.

The results obtained indicated a high incidence of the disease (80%) especially when cultivation is early and transplanting is carried out at the beginning of June. Other horticultural crops - lettuce, carrot, parsley and tomato - were found to be hosts of the phytoplasma but only tomato had a somewhat significant incidence (5%). Among the spontaneous flora, besides *Mercurialis annua* and *Cirsium* sp., the phytoplasma has been found on many *Convolvulus arvensis* plants. Such species therefore appear to be fundamental in the epidemic cycle of the disease both for dissemination (source of infection) and overwintering of the pathogen. Research on the vector of the phytoplasma have confirmed the role of *Hyalesthes obsoletus* (Maixner *et al.*, 1995) in the epidemiology of Stolbur: molecular analyses carried out on field collected insects showed a high percentage (45%) of stolbur-infected *H. obsoletus* and the transmission trials on celery test plants demonstrated the infectivity of the vector.

The investigation will continue in order to search for other cultivated and spontaneous host plants of the phytoplasma and identify additional insect vectors.

Key words: Phytoplasma, Stolbur, Celery, *Hyalesthes obsoletus*.

Lavori citati

- MAIXNER M., U. AHRENS, E. SEEMÜLLER, 1995. Detection of German grapevine yellows (Vergilbungskrankheit) MLO in grapevine, alternative hosts and a vector by specific PCR procedure. *European Journal of Plant Pathology*, **101**, 241-250.

- MARZACHÌ C., F. VERATTI, M. D'AQUILLO, A. VISCHI, M. CONTI, G. BOCCARDO, 2000. Molecular hybridization and PCR amplification of non-ribosomal DNA to detect and differentiate stolbur phytoplasma isolates from Italy. *Journal of Plant Pathology*, **82**, 201-212.
- OSLER R., L. CARRARO, N. LOI, A. GREGORIS, F. PAVAN, G. FIRRAO, R. MUSETTI, P. ERMACORA, A. LOSCHI, I. PERTOT, E. REFATTI, 1996. Le più importanti malattie da fitoplasmi nel Friuli Venezia Giulia - Atlante. *Notiziario ERSA*, **9**, (Suppl.), 1-78.

Autore di riferimento: Luogo Carraro - e-mail: luigi.carraro@uniud.it

**ASSOCIAZIONE DEL FITOPLASMA DELLO STOLBUR
(16SrXII-A) AD UN GIALLUME DELLA FRAGOLA
IN EMILIA-ROMAGNA**

R. Credi¹, F. Terlizzi¹, A.R. Bacini²

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

²Servizio Fitosanitario Regione Emilia-Romagna,
Via di Saliceto, 81, I-40129 Bologna

Nell'autunno del 2003, in alcuni vivai della provincia di Ravenna sono state osservate piante di fragola (*Fragaria x ananassa* Duch.), varietà "Tethis", con evidenti manifestazioni patologiche. I sintomi consistevano essenzialmente in un accentuato nanismo ed uno scarso sviluppo dell'apparato radicale. Inoltre, le foglie vecchie si presentavano accartocciate verso l'alto e mostravano una marcata colorazione rosso-violacea dei tessuti. Le foglie giovani erano invece clorotiche, con piccioli corti, di dimensione ridotta e a forma di coppa. Alcune piante ammalate sono state prelevate, messe in vaso e conservate in serra. La primavera seguente, queste manifestavano pure tipiche anomalie a livello dei fiori quali virescenza e fillodia dei petali. I fiori, essendo totalmente o parzialmente sterili, producevano frutti piccoli e malformati. Le foglie centrali apparivano piccole, asimmetriche, clorotiche e con i margini tipicamente ingialliti. Nelle piante si osservava poi un rapido deperimento caratterizzato da mancato accrescimento, bronzatura delle foglie periferiche, appassimento generalizzato ed infine morte. Date le caratteristiche di questo tipo di giallume, le indagini sono state orientate all'accertamento di una probabile natura fitoplasmatica del suo agente eziologico (Converse, 1987). Per raccogliere ulteriori informazioni, le indagini di campo sono continuate anche nella stagione vegetativa del 2004 e altre varietà di fragola affette da tale sintomatologia venivano individuate.

Le piante raccolte sono state saggiate per la presenza di fitoplasmi mediante nested PCR, utilizzando come bersaglio il DNA totale estratto dalle foglie e dai piccioli. In PCR diretta si impiegavano gli iniziatori (primers) universali R16F2/R2, mentre nelle prove di nested si usava la coppia di iniziatori R16(I)F1/R1, specifici per i fitoplasmi dei gruppi filogenetici 16SrI e 16SrXII (Lee *et al.*, 1994). L'amplificazione finale di un prodotto di circa 1100 paia di basi, confermava l'infezione in quattro piante di "Tethis" ed in una pianta delle seguenti altre varietà: "Camarosa", "Gemma", "Aromas", "Selva", "Queen Elisa" e "NF 20". Per contro, dal DNA estratto da piante sane non si evidenziava nessun amplificato. L'analisi del polimorfismo dei frammenti di restrizione (RFLP) mediante digestione con l'enzima *MseI* dei tratti di DNA amplificati, non metteva in rilievo differenze fra i fitoplasmi presenti nelle

piante delle diverse varietà. In generale i profili ottenuti erano simili a quello del fitoplasma dello Stolbur appartenente al gruppo filogenetico 16SrXII, sottogruppo A (Lee *et al.*, 1998). I risultati ottenuti sono stati confermati utilizzando i primers universali P1/P7 seguiti da una seconda PCR con la coppia di iniziatori fStol/rStol, che amplificano una zona specifica del DNA del fitoplasma dello Stolbur (Maixner *et al.*, 1995). I prodotti amplificati (579 nucleotidi) venivano poi clonati e sequenziati, ottenendo una omologia di sequenza del 98,9-100% rispetto ad un isolato da vite di questo procariota. Il nostro ritrovamento appare essere la prima segnalazione della presenza del fitoplasma dello Stolbur su fragola in Italia.

Parole chiave: Fragola, Giallume, PCR, Fitoplasma dello Stolbur.

Summary

Association of Stolbur phytoplasma (16SrXII-A) with a strawberry yellows disease in Emilia-Romagna

During the autumn of 2003, diseased plants of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) cv. Tethis were observed and collected from nurseries in Ravenna province (Emilia-Romagna region, northern Italy). Symptoms were essentially a conspicuous plant stunting accompanied by a very poor root systems. Older leaves were rolled upward and displayed a marked premature purple discoloration. New leaves showed size reduction, shortened petioles, chlorosis and were generally cupped. Some of these plants were potted and kept in greenhouse conditions. The following spring they exhibited typical floral abnormalities as virescent and phylloid petals. Flowers were fully or partly sterile producing small and deformed fruits. New foliage was dwarfed, asymmetrical, pale green with chlorotic margins. Later on, the affected plants expressed a quick decline consisting of growth cessation, bronzing of mature leaves, wilting and death. This strawberry yellows-type disease was suggestive of a phytoplasmal infection (Converse, 1987). To acquire more information, field inspections were extended to the 2004 growing season and additional cultivars affected by a similar disorder were identified.

Collected plants were assessed for phytoplasma infection by nested PCR with total DNAs from leaves and petioles as template. Universal primer pair R16F2/R2 was used in direct PCR while the R16(I)F1/R1 primer pair was employed in nested assays for specific amplification of rDNA sequences of 16SrI and 16SrXII phytoplasma groups (Lee *et al.*, 1994). Final amplification of a 1.1-kbp rDNA product confirmed infection of the following cultivars: Tethis (4 of 4 plants), Camarosa (1 of 1), Gemma (1 of 1), Aromas (1 of 1), Selva (1 of 1), Queen Elisa (1 of 1) and NF 20 (1 of 1). No products were

amplified from DNAs of healthy plants. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) of rDNA digested with *MseI* endonuclease, revealed no differences among phytoplasma isolates infecting the strawberry cultivars. Collectively, patterns were comparable to that of Stolbur phytoplasma belonging to the 16SrXII group, subgroup A (Lee *et al.*, 1998). Furthermore, these results were confirmed by the use of P1/P7 oligonucleotide universal primers and a second pair of nested primers, fStol/rStol, to amplify a specific target sequence from the Stolbur phytoplasma (Maixner *et al.*, 1995). Amplicons were recovered from gels, cloned and sequenced. The 579 bp fragments had a 98.9-100% nucleotide sequence identity with that of a grapevine Stolbur isolate. This finding appear to be the first report of Stolbur phytoplasma infecting strawberry in Italy.

Key words: Strawberry, Yellows disease, PCR, Stolbur phytoplasma.

Lavori citati

- CONVERSE R.H., 1987. Virus diseases of small fruits. United States Department of Agriculture, Washington D.C., *Agriculture Handbook*, **631**, 277 p.
- LEE I.-M., D.E. GUNDERSEN-RINDAL, R.W. HAMMOND, R.E. DAVIS, 1994. Use of mycoplasmalike organism (MLO) group-specific oligonucleotide primers for nested-PCR assay to detect mixed-MLO infections in a single host plant. *Phytopathology*, **84** (6), 559-566.
- 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.
- MAIXNER M., U. AHRENS, E. SEEMÜLLER, 1995. Detection of the German grapevine yellows (Vergilbungskrankheit) MLO in grapevine, alternative hosts and a vector by a specific PCR procedure. *European Journal of Plant Pathology*, **101**, 241-250.

**INFEZIONI DA FITOPLASMI IN *HYSSOPUS OFFICINALIS* L.
- ANALISI DELL'OLIO ESSENZIALE -**

A. Bertaccini¹, P. Vallesi¹, R. Gotti², A. Benni¹, M.G. Bellardi¹

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

²Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università di Bologna,
Via Belmeloro 6, I-40126 Bologna

L'issopo (*Hyssopus officinalis* L.; famiglia delle *Lamiaceae*) è una pianta erbacea perenne utilizzata per le numerose proprietà medicinali della parte aerea, nota in Europa fin dal 1960 quale ospite naturale del virus del mosaico del cetriolo (CMV); non risultano, invece, casi di infezioni naturali da fitoplasmi. Di seguito vengono riportati i risultati di indagini epidemiologiche eseguite nel nostro Paese nel biennio 2002-2003 e che hanno consentito, per la prima volta, di diagnosticare la presenza di questi procarioti in issopo. Considerando che in precedenti studi eseguiti in Italia su altre specie medicinali, fra cui l'iperico, è stata evidenziata la capacità di alcuni fitoplasmi di influire sulla composizione dell'olio essenziale e degli estratti metanolici (Bruni *et al.*, 2005), sono stati analizzati e comparati gli oli ottenuti da issopo sano ed infetto.

Parole chiave: Issopo, Olio essenziale, Fitoplasmi.

Summary

**Phytoplasmas's infection in *Hyssopus officinalis* L.
- Analyses of essential oil -**

The hyssop (*Hyssopus officinalis* L.; *Lamiaceae* family) is an herbaceous perennial herb known for the medicinal properties of its aerial part. Until 1990, in Europe, this specie was included in the list of cucumber mosaic virus (CMV) natural host; no reports regard phytoplasma infections.

During an epidemiological survey carried in 2002-2003 in Italy, these prokaryotes have been detected for the first time in hyssop. Considering that in previous Italian researches involving other medicinal herbs (such as *Hypericum perforatum* L.) the possibility for phytoplasmas to modify oil and methanolic extracts composition (Bruni *et al.*, 2005) has been reported, essential oils from healthy and infected hyssop plants were compared.

Key words: Hyssop, Essential oil, Phytoplasmas.

Lavori citati

- BRUNI R., F. PELLATI, M.G. BELLARDI, S. BENVENUTI, S. PALTRINIERI, A. BERTACCINI, A. BIANCHI, 2005. Herbal drugs quality and phytochemical composition of *Hypericum perforatum* L. affected by ash yellows phytoplasma infection. *Journal of agricultural and food chemistry*, **53** (4), 964-968.
- LEE I.-M., R.E. DAVIS, C. HIRUKI, 1991. Genetic interrelatedness among clover proliferation mycoplasma-like organism (MLOs) and other MLOs investigated by nucleic acid hybridization and restriction fragment length polymorphism analyses. *Applied Environmental Microbiology*, **57**, 3565-3569.
- SALVATORE G., M. NICOLETTI, V. DI GIOIA, R. CICCOLI, A. D'ANDREA, 1998. Caractérisation chimique de l'huile essentielle de Hysope (*Hyssopus officinalis* L. variété decumbens) des Alpes de Haute-Provence (Bonon, France). *Rivista Italiana EPPOS*, (numero speciale), 672-681.

**MYRTUS COMMUNIS L. NUOVO OSPITE
DI FITOPLASMI IN SARDEGNA**

**R. Garau¹, V.A. Prota¹, S. Paltrinieri², A. Sechi²,
G. Tolu¹, A. Bertaccini²**

¹Dipartimento di Protezione delle Piante, Sez. di Patologia Vegetale
e di Entomologia Agraria, Università di Sassari,
Via E. De Nicola, 1, I-07100, Sassari

²Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali (DiSTA),
Università di Bologna, Viale Fanin, 44, I-40127 Bologna

Myrtus communis L., specie arbustiva della macchia mediterranea, si estende, in Sardegna, per migliaia di ettari, dalla costa all'interno, in condizioni pedoclimatiche differenti. Le bacche e la biomassa fogliare, alimentano l'industria agro-alimentare e principalmente la produzione di liquori: Mirto rosso, ottenuto da infusioni a freddo di bacche in soluzione idroalcolica e Mirto bianco, ottenuto nello stesso modo da giovani foglie. Questi prodotti, particolarmente graditi dal consumatore sostengono un comparto di particolare dinamicità con un'offerta di mercato pari a tre milioni di bottiglie anno. La specie è stata, in quest'ultimo decennio, stante il suo impatto sull'economia regionale, oggetto di numerosi studi che hanno approfondito i processi di domesticazione e definito le tecniche di coltivazione. Ad oggi sono disponibili sul mercato vivaistico numerose cultivar selezionate per i loro caratteri produttivi. L'interesse sanitario per la specie assume in quest'ottica, una valenza prioritaria.

Durante il 2003, in indagini eseguite in campi di confronto varietale, è stato osservato un complesso sintomatico di particolare gravità. La sindrome, pur prevalente su alcune cultivar, era caratterizzata da una significativa anomalia vegetativa. Essa comprendeva ingiallimenti fogliari, scopazzi e marcata microfillia. La vegetazione basale si presentava prostrata e insolitamente strisciante. L'alterazione, a decorso epidemico, si è estesa in breve tempo da alcune piante ad altre, ed in un biennio all'intera parcella, anche se con differente gravità. La sintomatologia risultava simile a quella descritta in Italia meridionale da Camele *et al.*, (1996).

Indagini finalizzate all'individuazione di fitoplasmi, sono state eseguite nell'autunno del 2004 su sei campioni di tessuto nervale derivati dalla vegetazione di piante sintomatiche e prelevati in due differenti campi. Il DNA estratto è stato amplificato in PCR diretta con i primers universali P1/P7, in nested PCR con F1/B6 ed in seconda nested con R16F2/R2 (Duduk *et al.*, 2004). Tutti i campioni analizzati si sono rivelati infetti; la digestione con *TruI*, ha permesso l'identificazione in un caso, di fitoplasmi 16SrIII-B (ceppo di riferimento "Clover yellow edge") e di fitoplasmi del gruppo 16SrX (ceppo di riferimento "Apple proliferation"), negli altri. Il

prodotto ottenuto dall'amplificazione con F1/B6, riamplicato con i "primers" specifici R16(X)F1/R1 (Lee *et al.*, 1995) e sottoposto ad RFLP con *RsaI* e *SspI*, ha consentito di collocare i positivi ad AP nel sottogruppo ribosomico 16SrX-A. L'amplificazione con i "primers" specifici R16(I)F1/R1 (Lee *et al.*, 1995) del prodotto da F1/B6, ha reso possibile, a seguito della restrizione con *TruI*, l'identificazione di fitoplasmi 16SrXII-A in due campioni già riscontrati infetti da 16SrX-A.

Quanto riportato è, a nostra conoscenza, la prima segnalazione della presenza di fitoplasmi 16SrIII-B, 16SrX-A e 16SrXII-A in *M. communis*. Sono in corso indagini epidemiologiche e molecolari allo scopo di individuare le migliori strategie di controllo della malattia.

Parole chiave: Fitoplasmi, Mirto, PCR/RFLP, Nanismo.

Summary

***Myrtus communis* L. a new phytoplasma host in Sardinia**

Myrtus communis L., a bushy species of Mediterranean maquis, covers thousands of hectares in Sardinia (Italy). It is found from the coast to the interior of the island and in different soils and climatic zones. The berries and the leafy biomass are used in the food industry and, in the present case, in the production of liquors. These liquors are Red Mirto, which is made from cold infusions of the berries in hydro-alcoholic solution, and White Mirto, which is made in the same way but using the young leaves. These products are very popular with around three million bottles a year being sold, and have a growing market. Given the species importance for the regional economy, many studies have been made in recent decades which have increased our knowledge of the process of domestication by defining the best cultivation techniques. Nowadays many cultivars which have been selected for their productive characteristics are available in the nurseries. In this context the sanitary status of the plants is of great importance.

In 2003, during field studies comparing the performance of different cultivars, a severe series of symptoms was observed. The syndrome, although prevalent in certain cultivars, affected the majority of the plants, and was characterised by significant vegetative anomalies. These were a yellowing of the leaves showing also witches'-broom aspects, and strong microphyllia. The basal vegetation was prostrate and abnormally striped. As the epidemic developed, the previously mentioned alterations quickly spread from some plants to other on the rows, and, over a period of two years, to the entire plot, although the seriousness of the infection varied from plant to plant. These symptoms could be related to phytoplasmas infection resembling those mentioned by Camele *et al.*, (1996).

Studies aimed to assess the phytoplasmas presence were carried out in the autumn of 2004 on six samples of vein tissue from affected plants collected from two different fields.

The plant DNA was extracted and amplified in direct PCR with universal primers (P1/P7), in nested PCR with F1/B6, and in a second nested PCR with R16F2n/R2 (Gundersen-Rindal *et al.*, 1996). The amplified products digested with *TruI* allowed to identify 16SrIII-B phytoplasma (reference strain Clover yellow edge) on one sample and 16SrX phytoplasma group, on the others.

To confirm these results the F1/B6 products were further amplified in nested PCR with R16(X)F1/R1. The RFLP analyses with *RsaI* and *SspI*, allowed to identify the phytoplasmas as belonging to the 16SrX-A subgroup (reference strain Apple Proliferation). A further nested PCR with R16(I)F1/R1 on the F1/B6 template, after RFLP with *TruI*, showed that, 16SrXII-A phytoplasmas were present, in mixed infection with 16SrX-A, in two samples.

This is the first time, as far as we know, that 16SrIII-B, 16SrX-A and 16SrXII-A phytoplasmas are detected on *M. communis*. Epidemiological and molecular studies are in progress towards designing the possibility to contain further disease spreading .

Key words: *Myrtus communis*, Phytoplasmas, PCR/RFLP, Stunting.

Lavori citati

- CAMELE I., M. VIBIO, G.L. RANA, A. BERTACCINI, 1996. Studi preliminari sugli scopazzi dell'eucalipto e del mirto in Italia meridionale. *Atti Giornate fitopatologiche*, **2**, 523-528.
- GUNDERSEN-RINDAL D.F., I.-M. LEE, 1996. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathologia mediterranea*, **35**, 144-151.

VETTORI

Indagine su possibili vettori di apple proliferation in Trentino	
L. Mattedi, F. Forno, C. Cainelli, M. S. Grando	39
Identification of <i>Cacopsylla picta</i> (syn. <i>Cacopsylla costalis</i>) as a vector for apple proliferation phytoplasmas in Germany	
B. Jarausch-Wehrheim, N. Schwind, W. Jarausch, T. Peccerella, G. Krczal	43
Ruolo della psillidofauna del biancospino in relazione alla malattia degli scopazzi del melo	
R. Tedeschi, L. Bertignono, A. Alma.	47
Dispersione ed attività di volo giornaliera di <i>Scaphoideus titanus</i> Ball (<i>Homoptera Cicadellidae</i>)	
F. Lessio, Z. Balasz, A. Alma.	51
Indagine preliminare sugli auchenorrhinchi potenziali vettori di stolbur in un'area viticola del Lazio	
B. Bagnoli, F. Pinzauti, V. Trivellone	55
Osservazioni sul vettore del fitoplasma del legno nero della vite, <i>Hyalesthes obsoletus</i>, in Emilia-Romagna	
L. Milanese, R. Bondavalli, N. Mori, D. Dradi, I. Menozzi, A. Bertaccini	59

INDAGINE SUI POSSIBILI VETTORI DI APPLE PROLIFERATION IN TRENTINO

**L. Mattedi, F. Forno, C. Cainelli,
M.S. Grando, P. Bragagna,
M. Filippi, M. Deromedi**

Istituto Agrario San Michele all'Adige,
Via Mach 1, I-38010 San Michele all'Adige (TN)

Dal 1996 è in corso in Trentino un'estesa indagine nei frutteti avente lo scopo di individuare i possibili vettori di Apple Proliferation (AP), in particolare insetti fitomizi quali cicaline, psillidi ed afidi. Per quanto concerne le psille presenti sul melo, sono state individuate 12 specie, anche se le più comuni risultano essere *Cacopsylla melanoneura* e *Cacopsylla picta* (sin *Cacopsylla costalis*). Fin dal 1997 sono state effettuate prove di trasmissione con gli psillidi *C. picta* e *C. melanoneura*, e dal 2003 anche con la cicalina *Empoasca vitis* e con due specie di afidi (*Dysaphis plantaginea*, *Aphis pomi*). Per entrambe le specie di psille è stata dimostrata, in 7 anni di prove, un'attività vettrice. Nelle condizioni sperimentali attuate a S. Michele si è riscontrata un'efficienza di trasmissione di *C. melanoneura* piuttosto contenuta: 1 pianta su 278 (0,36 %) è risultata sintomatica e positiva ai test ELISA e Dapi. Con *C. picta* si è avuta trasmissione con manifestazione di sintomi in 11 piante su 342 (3,21 %). Finora le prove di trasmissione di AP con gli afidi e con le cicaline non hanno dato esiti positivi.

Sulla base dei monitoraggi effettuati sin dal 1997 è stato possibile inoltre descrivere i cicli biologici di *C. melanoneura* e *C. picta* nel nostro ambiente e sviluppare prime esperienze di contenimento. *C. melanoneura* compie una generazione all'anno ed è presente nei meleti dell'intero Trentino da fine gennaio a metà maggio-metà giugno. Per il suo eventuale contenimento il momento migliore si colloca all'inizio dell'ovodeposizione utilizzando dei prodotti abbattenti (Esteri fosforici o nuovi Piretroidi). Anche *C. picta* compie un'unica generazione all'anno ed è presente nei meleti del Trentino da fine marzo-inizio aprile fino a luglio. È diffusa principalmente in Val di Non ed in Val di Sole, anche se popolazioni in densità irrisoria sono state riscontrate in altre zone del Trentino. Per il suo eventuale contenimento il momento ideale è stato individuato nella post-fioritura (Esteri fosforici e/o neonicotinoidi).

Attraverso l'esposizione di piante spia in campo (dal 19 marzo 2002 al 3 ottobre 2002 ad intervalli di quindici giorni) è stato indagato il periodo di trasmissione del fitoplasma AP in condizioni naturali. Sono state riscontrate piante sintomatiche e infette in coincidenza del periodo che va dall'11 giugno al 24 giugno

e dal 24 giugno al 3 ottobre. Pertanto il maggior rischio per la trasmissione nel frutteto sembra coincidere con il periodo di migrazione della nuova generazione di *C. picta*.

Parole chiave: Fitoplasma Apple Proliferation, *Cacopsylla picta*, *Cacopsylla melanoneura*, Prove di trasmissione, Strategie di controllo.

Summary

Research on the possible vectors of Apple Proliferation in Trentino

Since 1996, a thorough research has been carried out in Trentino in order to identify the insect vectors of Apple Proliferation (AP) phytoplasma. Phloem-sucking insects like leafhoppers, psyllids and aphids have been investigated for their role in AP phytoplasma transmission. Regarding the psyllids present on apple trees, 12 species have been found. Among these *Cacopsylla melanoneura* and *Cacopsylla picta* (synonym *Cacopsylla costalis*) were the most abundant. Since 1997, transmission experiments have been carried out with the psyllids *C. picta*, *C. melanoneura* and since 2003 with the leafhopper *Empoasca vitis* and two aphid species (*Dysaphis plantaginea*, *Aphis pomi*). For both psyllid species a vector activity was demonstrated in 7 years of transmission trials. The transmission efficiency of *C. melanoneura* was very low: only 0.36% of the plants (1 plant out of 278) resulted symptomatic and AP phytoplasma-positive by ELISA and Dapi. *C. picta* transmitted AP phytoplasma repeatedly. Indeed, 3.21% of the plants (11 symptomatic plants out of 342) were AP phytoplasma-positive in transmission trials. Up to now, no transmission of AP phytoplasma by leafhoppers and aphids has been found.

Based on the continuous monitoring activity carried out in the orchards since 1997, the life cycle of both these species on apple was described and control strategies against these AP phytoplasma vectors were developed. *C. melanoneura* completes one generation per year and is present in the apple orchards of the whole Trentino from the end of January to the middle of May-middle of June. The best moment for its possible control takes place at the beginning of the ovoposition, using knocking down products (phosphoric esters or new pyrethroids). Also *C. picta* performs only one generation per year and remains in the apple orchards from the end of March-beginning of April until July. It is present mainly in Val di Non and in Val di Sole, even if populations in very low densities were found in other areas of the region too. The optimal moment for its possible control was identified after blossoming using phosphoric esters and/or neonicotinoids.

The natural AP phytoplasma transmission period in the orchards was investigated by the exposure of bait plants in the orchards from 19th March 2002 to 3rd October 2002 in bi-weekly intervals. AP phytoplasma-positive plants were found in the period between 11th June and 24th June and between 24th June and 3rd October. Thus, the migration period of the new generation of *C. picta* seems to be the period of highest risk of AP-transmission in the orchards.

Key words: Apple Proliferation phytoplasma, *Cacopsylla picta*, *Cacopsylla melanoneura*, Transmission trials, Control strategies.

Lavori citati

- FORNO F., A. BRANZ, L. MATTEDI, P. BRAGAGNA, C. CAINELLI, D. FORTI, M.E. VINDIMIAN, 2002. Un triennio di prove di trasmissione di AP (apple proliferation) tramite psille. *Atti Giornate Fitopatologiche*, **2**, 613-616.
- FRISINGHELLI C., L. DELAITI, M.S. GRANDO, D. FORTI, M.E. VINDIMIAN, 2000. *Cacopsylla costalis* (Flor,1861), vector of apple proliferation in Trentino. *Journal of Phytopathology*, **148**, 424-431.
- REFATTI E., R. CIFERRI, 1954. La virosi del tipo "scopazzi" in vivai di melo. *Annali di Sperimentazione Agraria*, **8**, 1543-1556.
- TEDESCHI R., D. BOSCO, A. ALMA, 2002. Population Dynamics of *Cacopsylla melanoneura* (Homoptera:Psyllidae), a Vector of Apple Proliferation Phytoplasma in Northwestern Italy. *Journal of Economic Entomology*, **95**, 544-551
- TOMASI F., A. BRANZ, M.S. GRANDO, F. FORNO, D. FORTI, M.E. VINDIMIAN, 2000. Individuazione di fitoplasmi del gruppo AP nelle psille presenti nei frutteti. *L'Informatore Agrario*, **38**, 51-54.

Lavoro svolto nell'ambito del Progetto SMAP, finanziato dal Fondo Unico per i Progetti di Ricerca della Provincia Autonoma di Trento, la cui coordinatrice scientifica è stata la dott.ssa M. Elisabetta Vindimian (1955-2004).

IDENTIFICAZIONE DI *CACOPSYLLA PICTA* (SYN. *CACOPSYLLA COSTALIS*) COME VETTORE DEL FITOPLASMA APPLE PROLIFERATION IN GERMANIA

**B. Jarausch-Wehrheim, N. Schwind, W. Jarausch,
T. Peccerella, G. Krczal**

AIPlanta, RLP AgroScience GmbH, Breitenweg 71,
D-67435 Neustadt an der Weinstrasse, Germany

Dal 2001 il ciclo di vita di potenziali psille vettori e la loro capacità di trasmettere il fitoplasma di apple proliferation (AP) furono oggetto di studio a Neustadt. Le specie di psille più abbondanti catturate nei frutteti commerciali, furono *Cacopsylla melanoneura* e *Cacopsylla picta*. La dinamica di popolazione di entrambe le specie su piante di melo venne monitorata fra il 2002 e il 2004. Tutte le psille furono testate tramite PCR per determinare la loro naturale infezione da fitoplasma. Malgrado un basso numero di animali catturati, il tasso di infezione delle *C. picta* catturate in campo fu circa del 10% per ogni anno mentre per *C. melanoneura* solo lo 0,2 % degli animali risultò essere naturalmente infetto da fitoplasma AP nel 2002 e nessun individuo infetto venne catturato nel 2003 e 2004.

Dal 2002, prove di trasmissione in serra furono condotte per poter studiare la capacità di trasmissione di adulti svernanti e animali della generazione estiva di *C. picta* e *C. melanoneura*. Adulti svernanti di *C. melanoneura* e *C. picta* furono catturati in differenti meleti ogni anno da febbraio a maggio. Gruppi di 5 fino a 30 individui furono messi in contenitori di vetro per 2-4 settimane su piante di melo giovani o piante sane provenienti da micropropagazione in vitro. Le psille morte furono raccolte e testate individualmente tramite PCR per determinare se infette da fitoplasma AP. Differenti parti delle piante test furono campionate 6 mesi dopo l'inoculazione e testate tramite PCR per fitoplasma AP.

Dal 2002 al 2004, 18 piante test inoculate con adulti svernanti di *C. picta* risultarono infette da fitoplasma AP e 51 individui di *C. picta* raccolti da queste piante infette furono trovate positive alla PCR. In nessun caso fu ottenuta trasmissione con adulti svernanti di *C. melanoneura* e tutti gli individui raccolti da piante test non infette risultarono negative al fitoplasma AP (Jarausch *et al.*, 2003).

La capacità di trasmissione della generazione estiva di *C. picta* e *C. melanoneura* fu testata con differenti metodiche sperimentali con individui catturati da speciali gabbie di incrocio. Fra il 2002 e il 2004, sei piante test sane divennero infette da fitoplasma AP e mostrarono i sintomi di AP sei mesi dopo l'inoculazione. In totale, 32 individui della generazione estiva di *C. picta* raccolti da queste piante test positive risultarono positive al fitoplasma di AP. Nessuna pianta test e nessun animale vennero trovati positivi al fitoplasma AP nelle prove di trasmissione con la generazione estiva di *C. melanoneura* (Jarausch *et al.*, 2004). I risultati dimostrano che *C. picta* è il solo vettore importante per

il fitoplasma di AP in Germania e mostra che gli adulti svernanti come gli individui della generazione estiva di *C. picta* sono in grado di trasmettere il fitoplasma di AP.

Parole chiave: Fitoplasma di apple proliferation, Dinamica di popolazione, Psille vettori.

Summary

Identification of *Cacopsylla Picta* (Syn. *Cacopsylla Costalis*) as a vector for apple proliferation phytoplasmas in Germany

The life cycle of potential psyllid vectors and their capability for transmission of apple proliferation (AP) phytoplasmas was investigated at Neustadt since 2001. The most abundant psyllid species in commercial orchards were *Cacopsylla melanoneura* and *Cacopsylla picta*. The population dynamics of both species on apple trees were monitored between 2002 and 2004. All psyllids were tested by PCR for their natural infection with AP phytoplasma. Despite a very low number of animals captured, the infection rate of field collected *C. picta* was about 10% each year while for *C. melanoneura* only 0,2% of the animals were naturally infected with AP phytoplasma in 2002 and no infected individuals were collected in 2003 and 2004. Since 2002, transmission trials in the greenhouse were conducted in order to study the transmission capability of overwintering adults and animals of the springtime generation of *C. picta* and *C. melanoneura*. Overwintering adults of *C. melanoneura* and *C. picta* were captured in different apple orchards each year from February to May. Groups of 5 to 30 individuals were caged for 2 to 4 weeks on apple seedlings or healthy micropropagated apple plants. Dead psyllids were collected and tested individually by PCR for AP phytoplasma infection. Different parts of test plants were sampled 6 months after inoculation feeding and tested by PCR for AP phytoplasma infection. From 2002 to 2004, 18 test plants inoculated with overwintering adults of *C. picta* became AP phytoplasma-infected and 51 individuals of *C. picta* collected from these infected test plants were found PCR-positive. In no case transmission was achieved with overwintering adults of *C. melanoneura* and all individuals collected from non-infected test plants were AP phytoplasma-negative. The transmission capability of the springtime generation of *C. picta* and *C. melanoneura* was tested with different experimental layouts with individuals collected from special breeding cages. Between 2002 and 2004, six healthy test plants became AP phytoplasma-infected and showed AP-symptoms 6 months after

inoculation. In total, 32 individuals of the springtime generation of *C. picta* collected on these positive test plants were AP phytoplasma-positive. Neither infected test plants nor AP phytoplasma-positive animals of the springtime generation of *C. melanoneura* were found in those transmission trials. The results demonstrate that *C. picta* is the only important vector of AP phytoplasmas in Germany and show that overwintering adults as well as individuals of the springtime generation of *C. picta* are able to transmit AP phytoplasmas.

Key words: Apple proliferation Phytoplasma, Population dynamics, Psyllid vectors.

Lavori citati

- JARAUSCH B., N. SCHWIND, W. JARAUSCH, G. KRCZAL, E. SEEMÜLLER, E. DICKLER, 2003. First report of *Cacopsylla picta* as a vector for apple proliferation phytoplasma in Germany. *Plant Disease*, **87**, 101 p.
- JARAUSCH B., N. SCHWIND, W. JARAUSCH, G. KRCZAL, 2004. Overwintering adults and springtime generation of *Cacopsylla picta* (synonym *C. costalis*) can transmit apple proliferation phytoplasmas. *Acta Horticulturae*, **657**, 409-413.

**RUOLO DELLA PSILLIDOFAUNA DEL BIANCOSPINO
IN RELAZIONE ALLA MALATTIA
DEGLI SCOPAZZI DEL MELO**

R. Tedeschi¹, L. Bertignono², A. Alma¹

¹Di.Va.P.R.A. Entomologia e Zoologia applicate all'Ambiente "Carlo Vidano",
Università di Torino, Via L. da Vinci 44,
I-10095 Grugliasco (TO)

²Institut Agricole Régional, Loc. La Rochère 1/A, I-11100 Aosta

Il biancospino è da sempre considerato l'ospite primario di *Cacopsylla melanoneura* (Förster), principale vettore di "*Candidatus Phytoplasma mali*" agente causale dell'apple proliferation (AP) nell'Italia nordoccidentale (Conci *et al.*, 1993; Lauterer, 1999; Tedeschi *et al.*, 2002; Tedeschi e Alma, 2004). La diffusione della pianta negli ambienti naturali e nei pressi degli areali melicoli ha indotto a intraprendere indagini allo scopo di valutare i rapporti e le interazioni tra il melo, il fitoplasma, l'insetto vettore e il biancospino, nonché di rilevare le altre specie di psille infeudate al biancospino e il loro eventuale ruolo nella trasmissione di fitoplasmi.

Cinque postazioni con piante spontanee di biancospino localizzate nell'Italia nordoccidentale sono state indagate mediante campionamenti con trappole cromotattiche gialle e mediante scuotimento meccanico dei rami da fine febbraio a fine ottobre. Le psille catturate sono state conteggiate e sottoposte a determinazione specifica. Gli individui raccolti mediante scuotimento meccanico dei rami, così come campioni di foglie di biancospino, prelevati in tutte e 5 le postazioni, sono stati saggiati mediante analisi molecolari per verificare la presenza di fitoplasmi. Il DNA di insetto e di pianta è stato prima sottoposto a PCR diretta utilizzando i primer generici per i fitoplasmi, P1/P7 (Schneider *et al.*, 1995), e quindi a PCR indiretta con i primer specifici per i fitoplasmi del gruppo AP, fO1/rO1 (Lorenz *et al.*, 1995). Per accertare la presenza di "*Ca. Phytoplasma mali*", gli ampliconi ottenuti sono stati sottoposti ad RFLP utilizzando l'enzima di restrizione *SspI* (Lorenz *et al.*, 1995).

Le tre principali specie di psille infeudate al biancospino (Conci *et al.*, 1993; Lauterer, 1999; Wheeler e Stoops, 2001) sono state catturate in tutte le postazioni esaminate, *C. melanoneura* e *C. peregrina* (Förster) in numero rilevante e *C. crataegi* (Schrank) in numero più esiguo. Altre specie di psillidi sono state catturate in modo sporadico. I campionamenti mediante trappole cromotattiche e scuotimento meccanico dei rami hanno permesso di rilevare la dinamica di popolazione delle tre specie nell'areale indagato. Le indagini molecolari mediante PCR hanno evidenziato che tutte e tre le specie sono in grado di veicolare fitoplasmi del gruppo AP e la digestione enzimatica con l'enzima *SspI*, effettuata su parte dei campioni risultati positivi, ha dato luogo a profili di restrizione corrispondenti a quello di "*Ca. Phytoplasma mali*".

Anche due campioni di biancospino provenienti da due diverse postazioni sono risultati positivi a fitoplasmi del gruppo AP.

La presente ricerca, oltre ad aver fornito informazioni sulla psillidofauna infeudata al biancospino nell'areale indagato, ha permesso di ottenere interessanti indicazioni sul ruolo di questa pianta nell'epidemiologia della malattia degli scopazzi del melo. È emerso che anche le specie *C. peregrina* e *C. crataegi*, catturate sul biancospino, sono in grado di veicolare fitoplasmi del gruppo AP. Inoltre, il fatto di aver reperito fitoplasmi del gruppo AP in piante di biancospino in campo, metterebbe nuovamente in discussione il ruolo del biancospino, non solo più come pianta ospite naturale della psilla *C. melanoneura*, principale vettore di AP al melo nell'Italia nordoccidentale, ma anche come serbatoio del fitoplasma. La conoscenza di queste interazioni e del reale ruolo delle specie nella trasmissione del procariote permetteranno di comprendere meglio l'epidemiologia della fitoplasmosi, che sta ormai causando danni sempre più gravi alla produzione melicola dell'Italia nordoccidentale.

Parole chiave: "*Ca. Phytoplasma mali*", *C. melanoneura*, *C. peregrina*, *C. crataegi*.

Summary

Role of the hawthorn psyllid fauna in relation to the Apple proliferation disease

Hawthorn has always been considered as the primary host of *Cacopsylla melanoneura* (Förster), the main vector of "*Candidatus Phytoplasma mali*", the causal agent of the apple proliferation (AP) disease in the northwestern Italy (Conci *et al.*, 1993; Lauterer, 1999; Tedeschi *et al.*, 2002; Tedeschi and Alma, 2004). The diffusion of the plant in the wild areas and in the surroundings of apple orchards persuaded to carry out a research to evaluate the relationship among apple plants, the phytoplasma, the insect vector and hawthorn plants, as well as to point out the other psyllid species present on hawthorn and their possible role in the phytoplasma transmission.

Surveys with yellow sticky traps and with the beat tray method were carried out in northwestern Italy in 5 areas with wild hawthorn plants from the end of February until the end of October. The caught psyllids were counted and specifically determined.

The specimens collected by the beat tray method as well as hawthorn leaf samples, collected in all the 5 areas, were molecularly analysed to detect phytoplasmas. Insect and plant DNA was firstly amplified in a direct PCR using the universal primer pair P1/P7 (Schneider *et al.*, 1995) and then nested with the primer pair fO1/rO1, specific for the AP-group phytoplasmas (Lorenz *et al.*, 1995). To confirm the presence of "*Ca. Phytoplasma mali*", some of the amplicons were digested with the restriction endonuclease *SspI* (Lorenz *et al.*, 1995).

The three primary hawthorn psyllid species (Conci *et al.*, 1993; Lauterer, 1999; Wheeler e Stoops, 2001) were collected in all the studied areas, *C. melanoneura* and *C. peregrina* (Förster) in a larger number and *C. crataegi* (Schrank) in a lower number. Other psyllid species were occasionally collected.

The surveys with yellow sticky traps allowed to study the population dynamics of the three psyllid species in the areas under investigation.

The molecular analysis by PCR revealed the presence of AP-group phytoplasmas in all the three psyllid species. Also two hawthorn leaf samples coming from two different areas were positive to AP-group phytoplasmas. RFLP analysis of some of the fO1/rO1 amplicons showed the typical “*Ca. Phytoplasma mali*” pattern.

The present work provided data on the hawthorn psyllid fauna in the region under investigation and interesting information on the role of that plant on the apple proliferation epidemiology. It emerged that also *C. peregrina* e *C. crataegi*, collected on hawthorn, are able to carry AP-group phytoplasma. Moreover, the presence of AP-group phytoplasmas in hawthorn plants in the field, could revalues the role of that plant, not only as natural host of the psyllid *C. melanoneura*, the main AP insect vector in northwestern Italy, but also as phytoplasma reservoir. The knowledge of those interactions and of the real role of the psyllid species in the phytoplasma transmission will allow to better understand the epidemiology of the AP disease that is causing serious damages to the apple production in the northwestern Italy.

Key words: “*Ca. Phytoplasma mali*”, *C. melanoneura*, *C. peregrina*, *C. crataegi*.

Lavori citati

- CONCI C., C. RAPISARDA, C. TAMAINI, 1993. *Atti dell'Accademia Roveretana degli Agiati*, a. 242 (1992) **ser. VII**, Vol. **II b**, 33-136.
- LAUTERER P., 1999. *Acta Musei Moraviae, Scientiae biologicae* (Brno) **84**, 71-151.
- LORENZ K.H., B. SCHNEIDER, U. AHRENS, E. SEEMÜLLER, 1995. *Phytopathology*, **85**, 771-776.
- SCHNEIDER E., E. SEEMÜLLER, C.D. SMART, B.C. KIRKPATRICK, 1995. *In: Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology*, (Razin S., J.G. Tully, eds), vol. I. Academic, San Diego, CA.
- TEDESCHI R., A. ALMA, 2004. *Journal of Economic Entomology*, **97** (1), 8-13.
- TEDESCHI R., BOSCO D., ALMA A., 2002. *Journal of Economic Entomology*, **95** (3), 544-551.
- WHEELER A.G., C.A. STOOPS, 2001. *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, **103** (1), 103-109.

**DISPERSIONE ED ATTIVITÀ DI VOLO GIORNALIERA
DI SCAPHOIDEUS TITANUS BALL
(HOMOPTERA CICADELLIDAE)**

F. Lessio¹, Z. Balasz², A. Alma¹

¹Di.Va.P.R.A. Entomologia e Zoologia applicate all'Ambiente "Carlo Vidano",
Università di Torino, Via L. da Vinci 44,
I-10095 Grugliasco (TO)

²Plant Health and Soil Conservation Institut of County Fejer,
2481 Velence, Ország út. 2, Hungary

Il cicadellide neartico *Scaphoideus titanus* Ball è stato introdotto in Europa negli anni '50, ed è presente in Italia dal 1963 (Vidano, 1964). Nonostante nell'areale di origine sia stato ritrovato su diverse essenze arboree ed arbustive (Alma, 2004), in Europa è strettamente ampelofago, ed è riconosciuto come il vettore del fitoplasma agente causale della Flavescenza dorata (FD), il più pericoloso e dannoso tra i giallumi della vite (Boudon-Padieu, 2003). Data l'importanza economica della FD, in Italia la lotta nei confronti di *S. titanus* è obbligatoria. Quindi, la conoscenza delle sue modalità di dispersione assume un'importanza primaria per l'attuazione di una corretta gestione fitosanitaria (Lessio e Alma, 2004a, 2004b).

L'attività di volo di *S. titanus* è stata studiata utilizzando trappole cromotattiche gialle: lo spostamento verticale è stato rilevato posizionando le trappole sia all'altezza della chioma (1,50 m da terra) sia al di sopra (2,40 m da terra), mentre l'influenza della disposizione delle piante è stata accertata mettendo trappole all'esterno ed all'interno di un vigneto sperimentale che presentava una densità d'impianto variabile. L'attività di volo giornaliera è stata osservata controllando le trappole ogni tre ore per cinque giorni consecutivi. In ogni condizione è stato anche rilevato il diverso comportamento di maschi e femmine.

Le catture sono state significativamente più elevate nelle zone a densità d'impianto maggiore, ed il numero di piante per metro quadrato è risultato correlato con la presenza di *S. titanus*. La cicalina non ha mostrato una propensione significativa a diffondersi all'esterno del vigneto, e soltanto pochissimi individui sono stati catturati nelle trappole poste al di sopra della chioma. La specie è risultata più attiva tra le 21.00 e le 8.00 (ora legale), mentre il movimento è stato ridotto durante le ore a maggior intensità luminosa. La sex ratio è stata sempre in favore dei maschi, tuttavia non sono state osservate differenze legate al sesso riguardo all'attività di volo oraria.

S. titanus è una specie monofaga a volo crepuscolare e sembra incapace di spostarsi a grande distanza dalla propria pianta ospite; la sua densità di popolazione diminuisce al diminuire della densità della vite; le femmine tendono a volare di meno rispetto ai maschi. Al fine di acquisire nuove conoscenze, ulteriori studi

dovranno essere condotti, utilizzando la tecnica del rilascio e ricattura di individui adulti marcati con polveri non radioattive.

Parole chiave: Vite, Flavescenza dorata, Cicalina, Vettore, Attività di volo.

Summary

Dispersal and daily flight activity of *Scaphoideus Titanus* Ball (Homoptera cicadellidae)

The nearctic leafhopper *Scaphoideus titanus* Ball has been introduced into Europe in the 1950s, and is present in Italy since 1963 (Vidano, 1964). Despite in the US it was found also on many trees and shrubs (Alma, 2004), in Europe it feeds only on grapevine, and is known to be the vector of the phytoplasma agent of Flavescence dorée (FD), the most threatening among grapevine yellows (Boudon-Padieu, 2003). Given the severe economic incidence of FD, in Italy compulsory measures against *S. titanus* are applied. Therefore, knowledge of its dispersal patterns is very important in order to apply a correct pest management (Lessio e Alma, 2004a, 2004b).

The flight activity of *S. titanus* was studied by means of yellow sticky traps: its vertical flight was investigated by placing traps within the canopy (1.50 m from the ground) and above (2.40 m from the ground), whereas its horizontal movement and the influence of the layout of planting was studied by placing traps inside and outside an experimental vineyard that had a different plant density. Daily flight activity was investigated by controlling sticky traps every three hours from the early morning to the evening for five consecutive days. Different behaviour of males and females was tested for all the mentioned conditions.

Trapping of *S. titanus* was significantly higher where grapevine was thicker, the number of insects caught being positively related to plant density. Little movement of the leafhopper occurred outside the vineyard, and captures above the canopy were very low. Its activity was greater from 21,00 to 08,00 hours (legal hour), whilst few individuals were trapped during daytime. Males were more abundant than females, but no differences in flight periodicity were found between genders.

S. titanus is a crepuscular and monophagous species, and its flight activity is quite restricted to grapevine canopy; population density of this pest decreases along with the density of its host plant. Females are less likely to fly than males. Further studies on dispersal patterns of *S. titanus*, by releasing and recapturing adults marked with non-radioactive powders, are to be carried out.

Key words: Grapevine, Flavescence dorée, Leafhopper, Vector, Flight activity.

Lavori citati

- ALMA A., 2004. The genus *Scaphoideus* in the world. The diffusion of *S. titanus* in Europe. *Third European Hemiptera Congress*, St. Petersburg, June 8-11, 3-5.
- BOUDON-PADIEU E., 2003. The situation of grapevine yellows and current research directions: distribution, diversity, vectors, diffusion and control. *In: Proceedings, 14th ICVG Conference*, 12-17 September 2003, Locorotondo (BA), Italy, 47-53.
- LESSIO F., A. ALMA, 2004. Dispersal patterns and chromatic response of *Scaphoideus titanus* Ball (*Homoptera Cicadellidae*), vector of the phytoplasma agent of grapevine Flavescence dorée. *Agrumicultural Forest and Entomology*, **6**, 121-127.
- LESSIO F., A. ALMA, 2004. Seasonal and daily movement of *Scaphoideus titanus* Ball (*Homoptera Cicadellidae*). *Environmental Entomology*, **33**, 1689-1694.
- VIDANO C., 1964. Scoperta in Italia dello *Scaphoideus littoralis* Ball cicalina americana collegata alla "Flavescence dorée" della Vite. *L'Italia Agricola*, **101**, 1031-1049.

**INDAGINE PRELIMINARE SUGLI AUCHENORRINCHI
POTENZIALI VETTORI DI STOLBUR
IN UN'AREA VITICOLA DEL LAZIO**

B. Bagnoli, F. Pinzauti, V. Trivellone

C.R.A. - Istituto Sperimentale per la Zoologia Agraria
Via Lanciola, 12/A, I-50125 Firenze

I fitoplasmi appartenenti al sottogruppo ribosomale 16SrXII-A (Stolbur) sensu Lee *et al.*, (1998) risultano piuttosto ubiquitari e possono essere rilevati in un'ampia gamma di piante ospiti sia coltivate che spontanee. Il vettore accertato per la vite è *Hyalesthes obsoletus* Signoret (Maixiner, 1994; Sforza *et al.*, 1998; Alma *et al.*, 2002). In Italia questo cixiide trasmette il fitoplasma associato alla malattia del Legno Nero (LN), un'ampelopatia diffusa in quasi tutte le nostre aree viticole. Tuttavia un chiaro quadro epidemiologico della malattia non è stato ancora completamente definito, infatti mentre nella maggior parte dei casi il LN ha un andamento non particolarmente preoccupante, in altri si manifesta con sintomatologia severa ed estesa diffusione, anche là dove non risulti presente *H. obsoletus*.

Allo scopo di indagare il possibile ruolo di questo e di altri insetti nella trasmissione di LN, a partire dalla primavera 2004 abbiamo preso in esame la composizione dell'auchenorrhincofauna di un vigneto laziale di cv. "Chardonnay" ubicato nel comune di Cisterna di Latina (Latina). La presenza di LN nell'impianto era stata accertata dall'Istituto Sperimentale per la Patologia Vegetale di Roma fin dal 1999 (Pasquini, com. pers.). Le indagini sono state condotte utilizzando retino entomologico e trappole cromotropiche gialle disposte sia all'interno del vigneto che in una vignetta adiacente non sottoposta alle normali pratiche colturali e su una siepe di bordo lungo l'argine di un canale.

Nel 2004 sulle trappole cromotropiche, esclusa la sottofamiglia Typhlocybae, sono state individuate complessivamente 16 specie di omotteri auchenorrhinchi, di cui 11 nella vigna, 4 nella vignetta adiacente e 14 sulla vegetazione di bordo. Le specie più abbondanti sono risultate *Anoplotettix putoni* Ribaut nella vigna e nella vignetta, rispettivamente con il 49% e il 64% sul totale degli individui catturati, e *Philaenus spumarius* L. sul bordo con il 22%. Per accertare l'eventuale acquisizione di fitoplasmi da parte degli esemplari catturati, 27 di questi sono stati sottoposti a diagnosi molecolare, amplificando la regione ribosomale mediante i primer universali P1-P7 (Deng & Hiruki, 1991; Smart *et al.*, 1996) in PCR diretta, seguita da nested-PCR con i primer R16F2n/R2 (Gundersen-Rindal *et al.*, 1996) e 16R758F/M23Sr (Gibb *et al.*, 1995; Padovan *et al.*, 1995). Gli ampliconi ottenuti in nested-PCR sono stati sottoposti all'analisi del polimorfismo della lunghezza dei frammenti di restrizione (RFLP) utilizzando 3 differenti enzimi. L'esame ha evidenziato che 1 esemplare di

H. obsoletus, su 2 saggiati, è risultato positivo al fitoplasma associato a LN (16SrXII-A) e che 1 esemplare di *Thamnotettix zelleri* Kirschbaum, su 9 saggiati, è risultato positivo a un fitoplasma del sottogruppo 16SrI-C.

Per quanto riguarda il 2005, essendo le indagini ancora in corso, vengono qui riportati solo i dati relativi ai primi due rilievi (12 e 26 maggio) effettuati con retino entomologico. Dal primo campionamento è emerso che mentre su vite risultavano presenti solo tiflocibini, la vegetazione di bordo era interessata da una notevole presenza di adulti di *T. zelleri* (35 esemplari catturati) e di forme giovanili di *A. putoni* (55 esemplari catturati). Con il secondo campionamento si è potuto constatare, a conferma di quanto osservato l'anno precedente, che nell'ambiente considerato, i primi adulti di *A. putoni* si portano su vite a fine maggio. Dalle analisi molecolari condotte su singoli adulti sono risultati positivi al fitoplasma del sottogruppo 16SrXII-A 1 esemplare di *T. zelleri* su 10 saggiati e 1 di *A. putoni* su 34 saggiati.

Sebbene i risultati finora conseguiti non permettano di formulare ipotesi concrete sul ruolo svolto dagli auchenorrhinchi riscontrati nella trasmissione del fitoplasma associato a LN, le positività molecolari accertate a carico di *H. obsoletus*, *A. putoni* e *T. zelleri*, stimolano a sviluppare ricerche bio-eco-etologiche ed epidemiologiche su queste e altre specie presenti nell'ambiente.

Parole chiave: Auchenorrhinchi, Vettori, Legno Nero, Italia centrale.

Summary

Survey on Auchenorrhyncha potential vectors of Stolbur in a Latium vineyard

Phytoplasmas belonging to ribosomal subgroup 16SrXII-A (Stolbur) sensu Lee *et al.*, (1998) are rather ubiquitous and can be detected in a wide range of wild and cultivated plants. *Hyalesthes obsoletus* Signoret is confirmed as vector to grapevine (Maixiner, 1994; Sforza *et al.*, 1998, Alma *et al.*, 2002). In Italy, this planthopper transmits Bois noir (BN), a widespread grapevine yellow disease. However, the epidemiology of the disease has not been clearly established. Although BN is usually not particularly harmful to viticulture, it occasionally presents severe symptoms and wide distribution, even when *H. obsoletus* is not detected.

To investigate the possible role of this species and other insects in the transmission of BN, since spring 2004 we have studied the Auchenorrhyncha fauna of a "Chardonnay" vineyard near Cisterna di Latina (Latina, Latium). BN has been detected in this vineyard since 1999 by the Istituto Sperimentale per la Patologia Vegetale (Pasquini, pers. comm.). The survey has carried out using entomological net and yellow sticky traps set in the "Chardonnay" vineyard, in a nearby untended vineyard and in a hedge along a drainage canal.

In 2004 sixteen species of homoptera auchenorrhyncha, Typhlocybae excepted, were identified on yellow sticky traps: 11 in the “Chardonnay” vineyard, 4 in the small untended vineyard and 14 in the hedge. *Anoplotettix putoni* Ribaut was the most frequent species in both the “Chardonnay” vineyard and the untended vineyard, comprising 49% and 64% of all individuals respectively; *Philaenus spumarius* L. was the most frequent species in the hedge (22%). Twentyseven specimens were subjected to molecular analysis to check for phytoplasmas. The ribosomal DNA region was amplified by direct PCR, with the universal primer pair P1-P7 (Deng & Hiruki, 1991, Smart *et al.*, 1996), and by nested-PCR, with the inner primer pairs R16F2n/R2 (Gundersen-Rindal *et al.*, 1996) and 16R758F/M23Sr (Gibb *et al.*, 1995; Padovan *et al.*, 1995). RFLP analysis, using three restriction endonucleases in single enzyme digestions, was applied to the amplicons obtained by nested-PCR. One out of 2 *H. obsoletus* analyzed was positive to phytoplasma belonging to ribosomal subgroup 16SrXII-A and 1 out of 9 *Thamnotettix zelleri* Kirschbaum analyzed was positive to phytoplasma belonging to ribosomal subgroup 16SrI-C.

As regards 2005, investigations are still ongoing; only data concerning the first two collections carried out with the entomological net (12th and 26th May) are reported. From the first sampling it emerged that Typhlocybae were present on the vine only while the hedge was affected by a large number of *T. zelleri* adults (35 specimens captured) and *A. putoni* nymphs (55 specimens captured). The second sampling confirmed the observations of the year before according to which the first *A. putoni* adults move on the vine, in the environment considered, at the beginning of May. Molecular analyses performed on each single adult showed that 1 out of 10 *T. zelleri* and 1 out of 34 *A. putoni* specimens were positive for phytoplasma belonging to ribosomal subgroup 16SrXII-A.

Although results obtained do not allow to set up hypotheses on the role of Auchenorrhyncha in transmitting the phytoplasma associated to BN, molecular positivity found for *H. obsoletus*, *A. putoni* and *T. zelleri*, indicates that ecological and epidemiological research on these and other species should be developed.

Key words: Auchenorrhyncha, Vectors, Stolbur, Central Italy.

Lavori citati

- ALMA A., G. SOLDI, R. TEDESCHI, C. MARZACHI, 2002. Ruolo di *Hyalesthes obsoletus* Signoret (Homoptera Cixiidae) nella trasmissione del Legno Nero della vite in Italia. *Petria*, **12** (3), 411-412.
- DENG S., C. HIRUKI, 1991. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and non culturable Mollicutes. *Journal of Microbiological Methods*, **14**, 53-61.

- GIBB K.S., A.C. PADOVAN, B.D. MOGEN, 1995. Studies on sweet potato little-leaf phytoplasma detected in sweet potato and other plant species growing in northern Australia. *Phytopathology*, **85** (2), 169-174.
- GUNDERSEN-RINDAL D.E., I.-M. LEE, 1996. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathologia Mediterranea*, **35**, 144-151.
- 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.
- MAIXNER M., 1994. Transmission of German grapevine yellows (Vergilbungskrankheit) by the planthopper *Hyalesthes obsoletus* (Auchenorrhyncha: Cixiidae). *Vitis*, **33**, 103-104.
- PADOVAN A.C., K.S. GIBB, A. BERTACCINI, M. VIBIO, R.G. BONFIGLIOLI, P.A. MAGAREY, B.B. SEARS, 1995. Molecular detection of Australian grapevine yellows phytoplasma and comparison with grapevine yellows phytoplasmas from Italy. *Australian Journal Grape Wine Research*, **1**, 25-31.
- 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 grapevine in France. *Journal of Phytopathology*, **146**, 549-556.
- SMART C.D., B. SCHNEIDER, C.L. BLOMQUIST, L.J. GUERRA, N.A. HARRISON, U. AHRENS, K.H. LORENZ, E. SEEMÜLLER, B.C. KIRCKPATRICK, 1996. Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of 16S-23S rRNA spacer region. *Applied and Environmental Microbiology*, **62** (8), 2988-2993.

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

**OSSERVAZIONI SUL VETTORE DEL FITOPLASMA
DEL LEGNO NERO DELLA VITE, *HYALESTHES OBSOLETUS*,
IN EMILIA-ROMAGNA**

**L. Milanesi¹, R. Bondavalli², N. Mori³, D. Dradi⁴,
I. Menozzi⁵, A. Bertaccini⁵**

¹Consorzio Fitosanitario Provinciale di Modena,
Via Andreoli, 13, I-41100 Modena

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

³Area Centro Studi, Via Garibaldi, 5, I-37057 San Giovanni Lupatoto (VR)

⁴Centrale Servizi e Sperimentazione Agroambientale (CSSAA),
Via Masiera, 1191, I-47020 Martorano (FC)

⁵Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali (DiSTA),
Università di Bologna, Viale Fanin, 44, I-40127 Bologna

Il legno nero della vite (BN, Bois Noir) è un giallume di crescente importanza economica ed epidemiologica, associato alla presenza di fitoplasmidi del gruppo 16SrXII-A (Stolbur) (Lee *et al.*, 1998) che sono trasmessi in Italia da *Hyalesthes obsoletus* Signoret (*Homoptera Cixiidae*) (Alma *et al.*, 2002).

Durante le stagioni vegetative 2003 e 2004, in vigneti nei quali erano presenti viti ammalate da BN, è stato effettuato il monitoraggio delle popolazioni di *H. obsoletus*. Il metodo di cattura utilizzato è stato lo sfalcio con retino entomologico e successiva aspirazione in flaconi. Tale sistema è risultato più efficace rispetto all'uso delle trappole cromotropiche gialle (Cavallini *et al.*, 2003). Sono in corso di valutazione anche trappole sperimentali tipo "malaise trap" modificata, "window trap" semplice e omni-directional. Il periodo di volo degli adulti, registrato nell'areale emiliano, corrisponde a quello riportato da Alma e Conti (2002). Dalle indagini condotte è stato evidenziato che il numero di adulti catturati è statisticamente superiore all'esterno (capezzagne e bordo) rispetto al centro del vigneto. Tale distribuzione è correlata allo stato di colonizzazione da parte dell'ortica (*Urtica dioica*) delle aree limitrofe ai vigneti; da un monitoraggio effettuato su 50 vigneti con presenza di ortica, è stato osservato che in 47 la pianta erbacea era presente ai bordi, in 3 esclusivamente all'interno ed in 13 la sua presenza era diffusa. La distribuzione spaziale dell'ortica giustifica i gradienti di malattia decrescenti dalle testate verso l'interno degli appezzamenti. Indipendentemente dalla localizzazione dell'ortica *H. obsoletus* è stato sempre ritrovato.

Le analisi molecolari condotte sugli adulti di *H. obsoletus* catturati, evidenziano una positività della popolazione di campo del 15,1% nel 2003 e del 26,6% nel 2004. Nel 2003 i risultati sono stati successivamente raggruppati a seconda del periodo di raccolta per verificare il momento di massima positività degli insetti che è risultato essere a fine giugno/inizi luglio.

Specifiche ricerche sono state condotte sulla possibilità e capacità del vettore di sopravvivere e completare il ciclo su alcune dicotiledoni poliennali scelte fra quelle più diffuse nell'areale emiliano, e risultate positive al fitoplasma BN (Credi *et al.*, 2004). Le specie utilizzate sono state: *Cirsium arvense*, *Convolvulus arvensis*, *Medicago sativa*, *Plantago major*, *Taraxacum officinale* e *U. dioica*. Nell'areale considerato l'ortica è da ritenersi la principale pianta ospite di *H. obsoletus*. Tra le essenze saggiate il vettore ha evidenziato una buona sopravvivenza su *P. major*, la capacità di ovideporre su tutte e quella di giungere allo sviluppo delle forme giovanili su *C. arvense*, *C. arvensis*, *M. sativa*, *P. major* e *U. dioica*. Sulla vite il cixiide sopravvive solo alcuni giorni.

I risultati acquisiti permettono di avere maggiori informazioni epidemiologiche sul BN, importanti al fine di delineare una possibile strategia di contenimento della malattia, in particolare per la salvaguardia della produzione nell'areale del Lambrusco.

Parole chiave: Vite, Legno nero, *Hyalesthes obsoletus*, Ortica.

Abstract

Observations on *Hyalesthes obsoletus*, grapevine bois noir phytoplasma vector, in Emilia Romagna Region

The Bois noir (BN) is a grapevine yellows of growing economical and epidemiological importance. It is associated to the presence of 16SrXII-A group phytoplasmas (Stolbur) (Lee *et al.*, 1998) and transmitted in Italy by *Hyalesthes obsoletus* Signoret (*Homoptera Cixiidae*) (Alma *et al.*, 2002).

A monitoring of *H. obsoletus* populations has been carried out, during 2003 and 2004 vegetative seasons, in vineyards where BN was known to occur. Insects have been captured with entomological nets and then with aspirators. This method resulted to be more efficient than the use of yellow chromotropic traps (Cavallini *et al.*, 2003), moreover various experimental traps are under evaluation such as modified "malaise trap", simple and omni-directional "window trap". Data of adults' flying period in the Emilian area showed to be the same as reported by Alma and Conti (2002). Surveys about adults' capture have statistically shown that they are mainly present along the perimeter of vineyards than the centre. This distribution is associated to the presence of nettle (*Urtica dioica*) along vineyards borders. Monitoring of 50 vineyards in which nettle was present have shown that on 47 farms this weed was present at borders, in 3 it was exclusively in the internal area and in 13 its presence was spread. The way nettle is distributed within the vineyards justifies the infection gradient which decreases from borders towards the centre of fields. No matter where nettle is located *H. obsoletus* has always been found.

Molecular analysis carried out by PCR/RFLP revealed that in 2003 the 15,1% of field collected *H. obsoletus* adults were infected with Stolbur phytoplasmas, while in 2004 the 26,6% of specimens were positive. In 2003 results have then been grouped according to the collection's dates in order to verify the period into which insects are highly positive to the phytoplasma; this period resulted to be between end of June and beginning of July.

Specific studies were performed to verify the possibility that the vector is able to survive and complete its biological cycle on some pluriannual dicotyledon, choosed among the most widespread in the Emilian area, and positive to the BN phytoplasmas (Credi *et al.*, 2004). The species employed were: *Cirsium arvense*, *Convolvulus arvensis*, *Medicago sativa*, *Plantago major*, *Taraxacum officinale* and *U. dioica*. In the studied area nettle is the principal host plant of *H. obsoletus*, however among the tested weeds, vector has revealed the following characteristics: good survival on *P. major*, capacity of laying eggs on all weeds, and to achieve nymphs development in *C. arvense*, *C. arvensis*, *M. sativa*, *P. major* and *U. dioica*. The cixiid survives only for a few days on grapevine.

Results obtained from this research enable us to have more epidemiological information about BN in Emilia region useful to better elaborate a containment strategy of the disease in Lambrusco growing areas.

Key words: Grapevine, Bois noir, *Hyalesthes obsoletus*, *Urtica dioica*.

Lavori citati

- ALMA A., M. CONTI, 2002. Flavescenza dorata e altre fitoplasmosi della vite: il punto su vettori ed epidemiologia. *Informatore Fitopatologico*, **10**, 31-35.
- ALMA A., G. SOLDI, R.M. TEDESCHI, C. MARZACHI, 2002. Ruolo di *Hyalesthes obsoletus* Signoret (*Homoptera Cixiidae*) nella trasmissione del Legno nero della vite in Italia. *Atti II Incontro Nazionale sulle Malattie da Fitoplasmii*, 57-58.
- CAVALLINI G., A. CASTIGLIONI, P. BORTOLOTTI, N. MORI, R. NICOLI ALDINI, S. BOTTI, A. MALOSSI, A. BERTACCINI, 2003. Flavescenza dorata e legno nero in vigneti del modenese. *L'Informatore Agrario*, **21**, 69-71.
- CREDI R., F. TERLIZZI, L. CRICCA, D. DRADI, 2004. Epidemiologia del Legno nero della vite. *L'Informatore Agrario*, **7**, 72-75.
- 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.

EPIDEMIOLOGIA

Studi epidemiologici sul giallume europeo delle drupacee (ESFY) in impianti peschicoli del veronese	
N. Mori, L. Giunchedi, D. Panato, D. Pignatta, C. Poggi Pollini, T. Visigalli	65
Struttura e dinamica della popolazione di apple proliferation in Trentino	
C. Cainelli, M. S. Grandi	69
Osservazioni epidemiologiche sui giallumi della vite nelle province di Modena e Reggio Emilia	
R. Bondavalli, L. Milanese, G. Cavallini, A. Montermini, P. Mazio, P. Bortolotti, R. Credi, V. Vicchi, A. Bertaccini	73
Presenza di fitoplasmi nella flora spontanea dei vigneti	
L. Filippin, E. Angelini, G. Lucchetta, L. Leandrin, M. Borgo	77
Secondo rinvenimento di flavescenza dorata della vite nelle Marche	
G. Romanazzi, S. Murolo, F. Terlizzi, S. Talevi, B.M. Branzanti, S. Nardi, R. Credi, V. Savino	81

**STUDI EPIDEMIOLOGICI SUL GIALLUME EUROPEO
DELLE DRUPACEE (ESFY) IN IMPIANTI PESCHICOLI
DEL VERONESE**

**N. Mori¹, L. Giunchedi², D. Panato³, D. Pignatta²,
C. Poggi Pollini², T. Visigalli⁴**

¹Area Centro Studi, Via Garibaldi, 5, I-37057 San Giovanni Lupatoto (VR)

²Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali (DiSTA),
Università di Bologna, Viale Fanin, 44, I-40127 Bologna

³Dipartimento di Agronomia Ambientale e Produzioni Vegetali,
Via dell'Università, 16, I-35020 Legnaro (PD)

⁴Servizio Fitosanitario Regionale Veneto,
Viale dell'Agricoltura, 1A, I-37060 Buttapietra (VR)

Il termine “giallume europeo delle drupacee” indica un gruppo di sindromi che colpiscono molte drupacee coltivate e spontanee in Europa. Queste affezioni sono indotte da un solo agente patogeno: il fitoplasma omonimo (ESFY= European Stone Fruit Yellow Phytoplasma), appartenente al gruppo tassonomico degli Scopazzi del Melo (16SrX), diffuso in natura dallo psillide *Cacopsylla pruni* (Carraro *et al.*, 2004). La diffusione della fitoplasmosi negli impianti di pesco era considerata trascurabile fino al 1995, ma risulta in crescita costante negli ultimi anni in vari comprensori peschicoli del Nord Italia. Le indagini, effettuate nel decennio 1995-2004, hanno riguardato numerosi pescheti della provincia di Verona in cui sono state effettuate ispezioni di campo almeno tre volte all'anno (in marzo, luglio, ottobre) e analisi molecolari mediante PCR, PCR-ELISA e nested-PCR (Poggi Pollini *et al.*, 2002). Nelle stesse aree è stato anche effettuato dal 2000 un monitoraggio sulla presenza di piante spontanee possibili serbatoi d'inoculo per ESFY e di psillidi (analizzati a gruppi costituiti da due insetti) del gen. *Cacopsylla* infetti dal patogeno.

I risultati ottenuti hanno fornito le seguenti indicazioni:

- nonostante l'eradicazione delle piante con sintomi, negli ultimi anni si è verificato un progressivo incremento della malattia nei pescheti, con una media del 2% di nuove infezioni ogni anno;
- l'andamento della malattia è fortemente influenzato dalla sensibilità del portinnesto; il 90% delle piante con sintomi evidenti e risultate infette erano infatti innestate su “GF 677”;
- solo piante spontanee del gen. *Prunus*, in particolare *P. cerasifera* e *P. spinosa* sono state riscontrate infette dal fitoplasma, e potrebbero così rappresentare una fonte d'inoculo per ESFY;

- le popolazioni di *C. pruni* sono normalmente di bassa entità, ma si riscontra sempre una elevata percentuale di gruppi di insetti infetti (> 10%);
- nei pescheti sono state catturate numerose altre specie del gen. *Cacopsylla*; vari individui di *C. pulchella* sono stati recentemente riscontrati infetti da ESFYP, utilizzando la real time PCR (Pignatta *et al.*, 2005).

Sono in corso prove di trasmissione per chiarire il possibile ruolo epidemiologico di *C. pulchella*, sospettato di trasmettere ESFYP in Spagna (Lavina *et al.*, 2004).

Parole chiave: Giallume europeo delle drupacee, Epidemiologia, *Cacopsylla pruni*, *C. pulchella*.

Summary

Epidemiological survey of European stone fruit yellow in several orchards in the Verona Area

In Europe, several syndromes caused by European Stone Fruit Yellow Phytoplasma (ESFYP), a member of the Apple Proliferation group (16SrX) have been described in several cultivated and wild stone fruit species. This pathogen can be spread naturally by the psyllid *Cacopsylla pruni* (Carraro *et al.*, 2004). Prior to 1995, ESFYP was only sporadically reported in peach trees orchards, but recent studies have indicated a spreading of this syndrome in Northern Italy. From 1995 to 2004, several orchards located in the province of Verona were inspected at least three times a year (in March, July and October) and molecular detection of ESFYP was performed by using PCR, PCR-ELISA and nested-PCR (Poggi Pollini *et al.*, 2002). Molecular tests were also performed on wild plants, located in the vicinity of the affected orchards and on groups of psyllids captured on cultivated and wild stone fruit trees since 2000.

The results obtained showed that:

- despite the eradication of the symptomatic plants, a progression of recorded infections was noted corresponding to an average of 2% of new infection each year;
- the majority of plants affected were grafted on rootstock "GF 677";
- as regards the wild plants examined, only wild *Prunus* spp. were found to be infected, especially *P.cerasifera* and *P.spinosa*, although asymptomatic;
- *C. pruni* populations are usually low, but numerous groups (>10%) were infected by ESFYP;
- several other *Cacopsylla* species were captured on peach trees or on the wild species.

Real time PCR analysis recently performed showed that some individuals of *C. pulchella* were positive for ESFYP (Pignatta *et al.*, 2005).

Transmission trials with *C. pulchella* are in progress to study the possible role of this psyllid in the spread of the disease, as suggested in Spain (Lavina *et al.*, 2004).

Key words: European Stone Fruit Yellow, Epidemiology, *Cacopsylla pruni*, *C. pulchella*.

Lavori citati

- CARRARO L., F. FERRINI, P. ERMACORA, N.LOI, 2004. Transmission of European Stone Fruit Yellows Phytoplasma to *Prunus* species by using vector and graft transmission. *Acta Horticulturae*, **657**, 449-453.
- LAVINA A., J. SABATE, M. GARCIA-CHAPA, A. BATTLE, E. TORRES, 2004. Occurrence and epidemiology of European Stone Fruit Yellows Phytoplasma in Spain. *Acta Horticulturae*, **657**, 489-494.
- PIGNATTA D., F. FORNI, L. GIUNCHEDI, M.GOBBER, L. MATTEDI, P. MIORELLI, C. POGGI POLLINI, C. RATTI, E. ROPELATO, 2005. Utilizzo della tecnica real time PCR per la valutazione del fitoplasma del giallume europeo delle drupacee (ESFYP) nel materiale vivaistico. Atti presente convegno.
- POGGI POLLINI C., P. MIORELLI, R. BISSANI, F. TERLIZZI, C. AGNOLIN, 2002. Diffusione del fitoplasma del giallume europeo delle drupacee (ESFYP) in impianti peschicoli della valle del Sarca (TN). *Atti Giornate Fitopatologiche*, 2002, **2**, 571-576.

Lavoro svolto con il contributo della Regione Veneto.

STRUTTURA E DINAMICA DELLA POPOLAZIONE DI APPLE PROLIFERATION IN TRENTINO

C. Cainelli, M. S. Grando

Istituto Agrario San Michele all'Adige,
Via Mach 1, I-38010 San Michele all'Adige (TN)

Apple Proliferation (AP) è una malattia causata da fitoplasmi diffusa nelle aree frutticole del centro e del sud Europa. In Trentino, AP è nota dal 1950, ma solo negli ultimi anni ha assunto un andamento epidemico con importanti ripercussioni economiche. Alcuni esperimenti hanno dimostrato che nelle condizioni locali *Cacopsylla picta* (ora sinonimo di *C. costalis*) gioca un ruolo nella trasmissione di AP alle piante di melo (Frisinghelli *et al.*, 2000) mentre la specie *C. melanoneura* è risultata finora solo ospite del patogeno.

Poiché non esistono trattamenti curativi per AP, l'azione sugli insetti vettori mirata al contenimento della malattia rappresenta una soluzione a breve termine del problema. In questo contesto, la conoscenza dell'esistenza e della distribuzione di diversi sottotipi del fitoplasma che potrebbero variare in virulenza, diventa importante per comprendere eventuali specificità di vettore o di efficienza di trasmissione.

Un obiettivo dei nostri studi è quindi la valutazione della variabilità genetica di un numero elevato di isolati di AP ottenuti da piante di melo infette e da insetti della zona frutticola trentina. Il campionamento riguarda diverse cultivar di melo in diverse combinazioni con portainnesti e tiene conto dell'età di manifestazione dei primi sintomi. Per quanto riguarda gli insetti, numerose psille sono catturate periodicamente nei frutteti commerciali ma anche in vecchi impianti abbandonati e suddivise per specie e stadi di sviluppo.

La nostra presentazione mostrerà la composizione della popolazione di AP emersa da due ampie indagini condotte su tutto il territorio frutticolo trentino negli anni 2002 (Cainelli *et al.*, 2003) e 2004. Sulla base dei profili PCR-RFLP, nella situazione locale sono stati osservati tutti i tre sottotipi di AP descritti in Jarausch *et al.*, (2000), con una bassissima incidenza del ceppo AP ed una predominanza di AT2.

Parole chiave: Fitoplasmi, Sottotipi, Profili di restrizione.

Summary

Population structure and dynamics of Apple proliferation in Trentino

Apple Proliferation (AP) is a phytoplasma-associated disease spread in all countries of Central and Southern Europe. In apple orchards of Northern Italy, AP is known since 1950 but only in recent years it has become a serious epidemic and an economic problem. In 2000, our experiments (Frisinghelli *et al.*, 2000) proved that *Cacopsylla costalis* (now synonym of *C. picta*) plays a role as a vector of the phytoplasma in the apple growing area of Trentino where few years later, AP was also detected in the psyllid species *C. melanoneura*.

As no curative treatments for apple proliferation exist, the prevention of the disease spread by insect vectors is the only short term solution to the problem. In this context the knowledge about the occurrence and distribution of different phytoplasma subtypes which may vary in their virulence, is important in order to understand vector specificities or different transmission efficiencies.

For this reason, one purpose of our studies is to evaluate the genetic variability of a large number of AP isolates from naturally AP-infected apple trees and insects collected around the local fruit growing region. Plant sampling involves different cultivars and rootstock-scion combinations as well as apple trees showing AP symptoms since different times. About insects, psyllids are picked up periodically in commercial orchards and in abandoned orchards, and split up by species and developmental stages. Our presentation will show the composition of AP population as emerged from two wide surveys conducted in 2002 (Cainelli *et al.*, 2003) and 2004. Three different PCR-RFLP profiles following Jarausch *et al.*, (2000) were finally detected with very few cases belonging to the AP subtype and the predominance of AT2 subtype.

Key words: Phytoplasma, Sub-types, Restriction pattern.

Lavori citati

- CAINELLI C., C. BISOGNIN, M.E. VINDIMIAN, M.S. GRANDO, 2003. Genetic variability of AP phytoplasmas detected in the apple growing area of Trentino (North Italy). Proceedings of the XIXth International Symposium on Virus and Virus-Like Diseases of Temperate Fruit Crops - Fruit Tree Diseases. *Acta Horticulturae*, **657**, 425-430.

- FRISINGHELLI C., L. DELAITI, M.S. GRANDO, D. FORTI, M.E. VINDIMIAN, 2000. *Cacopsylla costalis* (Flor, 1861), as a vector of apple proliferation in Trentino. *Journal of Phytopathology*, **148**, 424-431.
- JARAUSCH W., C. SAILLARD, B. HELLIOT, M. GARNIER, F. DOSBA, 2000. Genetic variability of apple proliferation phytoplasmas as determined by PCR-RFLP and sequencing of a non-ribosomal fragment. *Molecular Cell Probes*, **14**, 17-24.

Progetto SMAP, Fondo per la Ricerca della Provincia Autonoma di Trento

**OSSERVAZIONI EPIDEMIOLOGICHE SUI GIALLUMI
DELLA VITE NELLE PROVINCE DI MODENA E
REGGIO EMILIA**

**R. Bondavalli¹, L. Milanesi², G. Cavallini², A. Montermini¹,
P. Mazio¹, P. Bortolotti², R. Credi³, V. Vicchi⁴, A. Bertaccini³**

¹Consorzio Fitosanitario Provinciale di Reggio Emilia,
Via Gualerzi, 32, I-42100 Reggio Emilia

²Consorzio Fitosanitario Provinciale di Modena,
Via Andreoli, 13, I-41100 Modena

³Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali (DiSTA),
Università di Bologna, Viale Fanin, 44, I-40127 Bologna

⁴Servizio Fitosanitario della Regione Emilia Romagna,
Via di Corticella, 133, I-40129 Bologna

Fitoplasmi della vite agenti di flavescenza dorata (Flavescence Doreé, FD) e di legno nero (Bois Noir, BN), noti con il termine generico di “giallumi”, sono stati rinvenuti in campioni prelevati in provincia di Modena e Reggio Emilia fin dall’anno 2000 (Bertaccini *et al.*, 2001).

Le indagini epidemiologiche, effettuate dai rispettivi consorzi fitosanitari provinciali nel quinquennio 2000 - 2004, hanno evidenziato la diffusa presenza sul territorio di viti con sintomi ascrivibili a giallumi.

Gli esiti delle analisi effettuate nel quinquennio su viti sintomatiche hanno mostrato la netta prevalenza del fitoplasma associato a BN. Nella provincia di Reggio Emilia su 557 campioni complessivamente saggiati mediante PCR/RFLP, il 55,7% è risultato positivo a BN ed il 14,7% a FD; analogamente, nelle 463 analisi effettuate in provincia di Modena i campioni positivi a BN sono stati il 67,4% e quelli a FD 10,8%. Inoltre, il 2,3% dei campioni reggiani è risultato positivo ad entrambi i fitoplasmi. Interessante anche il numero di campioni sintomatici risultati negativi: il 27,3% a Reggio Emilia e quasi il 21% a Modena. La contemporanea presenza sul territorio dei due fitoplasmi è stata riscontrata nella maggior parte dei comuni vitati reggiani e solo in una parte di quelli modenesi.

La presenza di giallumi è stata messa in relazione con la cultivar, il sistema di allevamento, la conduzione agronomica e fitoiatrica del vigneto. La distribuzione spaziale delle viti ammalate negli impianti delle due province tende a presentarsi con un andamento decrescente dalla periferia verso l’interno, come già evidenziato in Romagna (Credi *et al.*, 2004).

Analisi molecolari sono state condotte anche su piante erbacee presenti all’interno ed in vicinanza dei vigneti rilevando la presenza del fitoplasma di BN in alcune specie di dicotiledoni poliannuali (Botti *et al.*, 2005).

I risultati del monitoraggio effettuato hanno permesso di evidenziare che le misure adottate dal 2000 contro FD hanno consentito di contenerne l'andamento epidemico. Ciò non si è verificato per il legno nero, diventato di gran lunga l'ampelopatia più pericolosa e di difficile controllo in queste due province. Gli aspetti epidemiologici in parte sconosciuti, unitamente alla presenza dell'agente eziologico e dell'insetto vettore, il *Cixiide Hyalesthes obsoletus*, in piante erbacee normalmente presenti nell'ecosistema vigneto, hanno impedito, finora, un'efficace strategia di lotta con la conseguente ampia e rapida diffusione territoriale di BN.

Parole chiave: Vite, Legno nero, Flavescenza dorata, Modena, Reggio Emilia.

Summary

Epidemiological investigation about grapevine yellows in Modena and Reggio Emilia provinces

Since the year 2000, grapevine Flavescence Dorée (FD) and Bois Noir (BN) phytoplasmas were found in grapevine growing areas of Modena and Reggio Emilia provinces (northern Italy). Epidemiological investigations carried out by the provincial Plant Protection Services throughout a five-year period (2000 to 2004), have highlighted the wide presence of these pathogens in all the grapevine growing areas.

The results obtained from molecular analysis (PCR/RFLP) performed throughout the all period on symptomatic plants, have shown the striking prevalence of BN phytoplasmas. Out of 557 samples collected in Reggio Emilia province, 55,7% were positive to BN whereas 14,4% of the tested plants resulted infected by FD. As regard the 463 analyses on samples collected in Modena province, samples positive to BN phytoplasmas were 67,7% and those positive to FD were 10,8%. Moreover the 2,3% of the Reggio Emilia samples appeared positive to both phytoplasmas. A number of symptomatic grapevines were negative: 27,7% in Reggio Emilia and 21% in Modena provinces. Contemporary presence in the territory of the two phytoplasmas has been noticed in the majority of the counties around Reggio Emilia, while very few in the ones around Modena.

Incidence data of yellows were related to the cultivar, training systems, and agronomic conduction of the vineyards. Spatial distribution of yellows diseased plants in the vineyards of the two provinces shows with a gradient decreasing from the edges to the inner parts, as was previously reported in other yellows infected vineyards (Credi *et al.*, 2004).

Molecular analysis performed on herbaceous plants around and inside the vineyards demonstrated the presence of BN phytoplasmas in some dicotyledons species (Botti *et al.*, 2005). Control measures adopted from

2000 against FD spreading allowed to greatly reducing its epidemic spreading in these provinces. This has not occurred for BN that has become eventually the most dangerous grapevine phytoplasma disease in the two provinces. Wide presence of important epidemiological factors such as etiological agent, insect vector (*Hyalesthes obsoletus*), herbaceous plants in vineyard's ecosystem, have so far avoided to carry out an efficient control strategy, with the consequent rapid and large spreading of BN in these vineyards.

Key words: Grapevine, Bois noir, Flavescence dorée, Modena, Reggio Emilia.

Lavori citati

- BERTACCINI A., S. BOTTI, M. MARTINI, R. COLLA, G. MAZZALI, P. MAZIO, M. POZZA, S. MEGLIORALDI, M. VINGIONE, 2001. La Flavescenza dorata in Emilia: caratterizzazione molecolare del ceppo in fase di diffusione. *L'Informatore Agrario*, **47**, 97-100.
- BOTTI S., S. PALTRINIERI, N. MORI, L. MILANESI, R. BONDAVALLI, A. BERTACCINI, 2005. Variabilità molecolare di fitoplasmi 16SrXII in vigneti delle province di Modena e Reggio Emilia. Atti III incontro Malattie da fitoplasmi, Milano 22-24 giugno 2004, *Petria*, **15** (1/2), 121-124.
- CREDI R., F. TERLIZZI, L. CRICCA, D. DRADI, 2004. Epidemiologia del legno nero della vite. *L'Informatore Agrario*, **7**, 72-75.

PRESENZA DI FITOPLASMI NELLA FLORA SPONTANEA DEI VIGNETI

**L. Filippin, E. Angelini, G. Lucchetta,
L. Leandrin, M. Borgo**

C.R.A. - Istituto Sperimentale per la Viticoltura,
Viale XXVIII Aprile, 26, I-31015 Conegliano (TV)

Le ricerche sulle epidemie da giallumi della vite hanno portato a prendere in considerazione l'habitat viticolo, al fine di evidenziare potenziali sorgenti di fitoplasmi non solo tra il genere *Vitis*, ma anche sulla flora spontanea. Fra il 2002 ed il 2004 sono stati esaminati con tecniche PCR/RFLP circa 1500 campioni di piante spontanee pluriennali, erbacee e legnose, raccolte dalle siepi di bordo dei vigneti e fra i filari in circa 30 aziende viticole, localizzate per la maggior parte nella provincia di Treviso. I campioni appartenevano a circa 115 specie diverse.

Diversi fitoplasmi sono stati ritrovati in alcuni campioni di *Clematis vitalba*, *Sambucus nigra*, *Cornus sanguinea*, *Prunus spinosa*, *Ulmus glabra*, *Ulmus minor*, *Ulmus* spp.

Per quanto riguarda la clematide, la raccolta è stata eseguita in 14 aziende. Piante infette sono state trovate in 7 vigneti, di cui 4 in provincia di Treviso, 2 in Friuli e 1 in Lombardia. Circa il 40% dei campioni (43 su 110) contenevano il fitoplasma FD-C; inoltre tutte le piante infette mostravano in campo sintomi di rossori e di giallumi diffusi. Questi risultati, oltre a confermare quanto già rinvenuto in precedenti ricerche eseguite in Veneto (Angelini *et al.*, 2004), mostrano che queste potenziali sorgenti di FD sono diffuse anche in altre regioni. Una clematide, che si era rivelata affetta da FD-C nel primo anno di indagine, è stata riesaminata a partire da maggio in poi dell'annata successiva, per verificare quando il fitoplasma fosse identificabile tramite PCR. I risultati del test molecolare sono stati positivi già da giugno, sebbene le foglie non mostrassero ancora chiari sintomi. Ciò evidenzia che anche piante senza sintomi possono comunque essere infette.

I campioni di sambuco raccolti sono stati 18, da 5 aziende diverse. Le piante provenienti da 2 vigneti in provincia di Treviso si sono rivelate infette con il fitoplasma del Legno nero. È il primo ritrovamento di un fitoplasma STOL in questa specie; sintomi di giallume nel sambuco erano stati osservati in precedenza, anche se l'agente eziologico non era mai stato identificato (Marcone *et al.*, 2002).

I campioni di *C. sanguinea* raccolti sono stati 19, da 4 aziende diverse. Tre piante provenienti da un'unica azienda in provincia di Treviso si sono rivelate infette con fitoplasmi: due campioni con il fitoplasma STOL, un campione con un fitoplasma del gruppo 16SrX. In precedenza fitoplasmi su *C. sanguinea* erano stati segnalati in Francia ed appartenevano al gruppo 16SrXII-A (Jarausch *et al.*, 2001).

Analogamente un fitoplasma del gruppo 16SrX è stato rinvenuto in un campione di *Prunus* spp. proveniente dalla provincia di Treviso, che mostrava giallumi accentuati. Gli altri campioni di pruno (8 in totale, raccolti da 4 aziende diverse) sono risultati negativi. Il risultato è in accordo con i dati di letteratura.

Le piante di olmo esaminate sono state in totale 25, provenienti da 6 aziende del Veneto e del Friuli. I campioni positivi per la presenza del fitoplasma ULW sono stati 8, raccolti in 3 vigneti. I risultati sono in accordo con i dati di letteratura.

Summary

Presence of phytoplasmas on wild plants in vineyards

Studies on grapevine yellows epidemics lead us to take into account the viticultural habitat, with the aim to find sources of phytoplasmas not only on *Vitis* species, but also on spontaneous flora. During 2002-2004 approximately 1500 samples of wild herbaceous and woody plants have been analyzed with PCR/RFLP techniques. They were collected in underbrush close to approximately 30 vineyards, mostly localized in the province of Treviso. Samples belonged to about 115 different species.

Different phytoplasmas have been identified in some plants of *Clematis vitalba*, *Sambucus nigra*, *Cornus sanguinea*, *Prunus spinosa*, *Ulmus glabra*, *Ulmus minor*, *Ulmus* spp.

As far as is concerning the clematis, samples were collected from 14 farms. Diseased plants have been found in 7 vineyards: 4 located in the province of Treviso, 2 in Friuli and 1 in Lombardy. About 40% of the samples collected (43 out of 110) were infected with the FD-C phytoplasma; moreover all the diseased plants showed yellow or reddish coloration of the leaves. These results on one side confirm data obtained in previous studies carried out in Veneto (Angelini *et al.*, 2004), while on the other they show that these potential sources of FD are present also in other areas. A clematis, which had been found infected with FD-C in the first year of surveying, have been analysed in the following year starting from May, in order to verify when the phytoplasma was detectable by PCR. Results of molecular tests were positive already in June, although leaves did not show any symptoms. These findings point out that also plants without symptoms can be infected.

Eighteen elder tree samples were tested, coming from 5 farms. Two plants collected from two vineyards in the province of Treviso were infected with the phytoplasma associated to Bois noir. This is the first report of STOL phytoplasma in elder tree; yellows symptoms on this species had been previously observed, even if the etiological agent was never identified up to date (Marccone *et al.*, 2002).

Nineteen *C. sanguinea* samples were examined, collected in 4 farms. Three plants, all coming from the same farm in Treviso province, gave positive results to the PCR assay. Two of them were infected with STOL phytoplasma, one with a phytoplasma belonging to the 16SrX group. Occurrence of phytoplasmas in *C. sanguinea* were described in France, where phytoplasmas belonging to the ribosomal group 16SrXII-A were found (Jarausch *et al.*, 2001).

A phytoplasma belonging to the 16SrX ribosomal group was found in one sample of *Prunus* spp., collected in province of Treviso, showing strong yellows symptoms. Other samples of *Prunus* spp. (8 in total, coming from 4 farms), were not infected with phytoplasmas. Results are in agreement with literature data.

Twenty-five elm trees were examined, coming from 6 farms of Veneto and Friuli. Eight samples gave positive results in PCR/RFLP assay for the presence of ULW phytoplasma. Results are in agreement with literature data, being the presence of this phytoplasma previously reported in elm.

Key words: Phytoplasma, Vineyard, Spontaneous plants.

Lavori citati

- ANGELINI E., F. SQUIZZATO, G. LUCCHETTA, M. BORGO, 2004. "Detection of a phytoplasma associated with grapevine Flavescence dorée in *Clematis vitalba* L.", *European Journal of Plant Pathology*, **110**, 193-201.
- MARCONE C., 2002. "Fitoplasmosi di piante forestali, arbustive ed ornamentali legnose in Europa". *Petria*, **12**, 381-386.
- JARAUSCH W., B. JARAUSCH-WEHRHEIM, J.L. DANET, J. BROQUAIRE, F. DOSBA, C. SAILLARD, M. GARNIER, 2001. Detection and identification of European stone fruit yellows and other phytoplasmas in wild plants in the surroundings of apricot chlorotic leaf roll-affected orchards in southern France. *European Journal of Plant Pathology*, **107**, 209-217.

Autore di riferimento: Elisa Angelini - e-mail: elisa.angelini@ispervit.it

SECONDO RINVENIMENTO DI FLAVESCENZA DORATA DELLA VITE NELLE MARCHE

**G. Romanazzi¹, S. Murolo¹, F. Terlizzi², S. Talevi³,
B.M. Branzanti¹, S. Nardi³, R. Credi², V. Savino⁴**

¹Dipartimento di Scienze Ambientali e delle Produzioni Vegetali,
Università Politecnica delle Marche, Via Brecce Bianche, I-60131 Ancona

²Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali (DiSTA),
Università di Bologna, Viale Fanin, 44, I-40127 Bologna

³Servizio Fitosanitario Regionale - ASSAM, Via Alpi, 21, I-60131 Ancona

⁴Dipartimento di Protezione delle Piante e Microbiologia Applicata,
Università e Istituto di Virologia Vegetale, CNR,
Via Amendola, 165/A, I-70126 Bari

I principali fitoplasmi associati ai “giallumi della vite” diffusi in Italia, quello della Flavescenza Dorata (FD) e quello del Legno Nero (LN), sono rispettivamente inseriti nei gruppi tassonomici 16SrV del Giallume dell’olmo e 16SrXII dello Stolbur (Lee *et al.*, 1998). L’infezione su vite di fitoplasmi appartenenti ai gruppi 16SrI (Giallume dell’astro), 16SrIII (Malattia X) e 16SrX (Scopazzi del melo) è stata pure riportata. In base all’ultima classificazione, i fitoplasmi agenti di FD e LN si ritrovano nel genere “*Candidatus Phytoplasma*” specie “*vitis*” e “*solani*”, rispettivamente (Firrao *et al.*, 2004). La FD è una malattia da quarantena soggetta a lotta obbligatoria. Un suo focolaio è stato recentemente segnalato anche nelle Marche (Credi *et al.*, 2002). Il LN appare invece diffuso in diversi comprensori della Regione, mentre sporadica è apparsa la presenza di fitoplasmi del gruppo 16SrIII (Romanazzi *et al.*, 2004).

Obiettivo della ricerca è stato il monitoraggio dei giallumi della vite in vigneti commerciali e nelle collezioni di germoplasma viticolo del territorio marchigiano. Le analisi molecolari sono state effettuate estraendo il DNA totale dalle nervature fogliari di piante con sintomi e amplificandolo mediante nested-PCR, secondo le modalità già riportate (Credi *et al.*, 2002; Romanazzi *et al.*, 2004). I prodotti finali di reazione sono stati poi sottoposti a digestione enzimatica (*TaqI* e *MseI*) per evidenziare il polimorfismo dei frammenti di restrizione (RFLP), visualizzandoli su gel di poliacrilammide previa colorazione con nitrato di argento. Le analisi effettuate hanno confermato la diffusa presenza del fitoplasma del LN in numerosi vigneti e in tutte le province della Regione, nonché nelle collezioni di germoplasma viticolo. Con la presente indagine, in un vigneto di “Montepulciano” di circa 30 anni, situato in località Ripatransone (AP), è stato identificato un secondo focolaio di FD. Il fitoplasma associato è stato caratterizzato risultando, come per il caso iniziale, appartenere al sottogruppo 16SrV-C.

Parole chiave: Vite, Fitoplasmi, Nested-PCR, RFLP.

Summary

A second finding of Flavescence dorée in Marche region

The main phytoplasmas associated with “grapevine yellows” found in Italy, the causal agents of Flavescence Dorée (FD) and Bois Noir (BN), are classified in the taxonomic groups 16SrV (Elm Yellows) and 16SrXII (Stolbur), respectively (Lee *et al.*, 1998). The occurring of vines infected by phytoplasmas belonging to the groups 16SrI (Aster Yellows), 16SrIII (X-Disease), and 16SrX (Apple Proliferation) is also reported. According to a recent reclassification, the agents of FD and BN are designated as “*Candidatus* Phytoplasma” species “vitis” and “solani”, respectively (Firrao *et al.*, 2004). FD is a quarantine disease subjected to mandatory control. Recently, it was also found in Marche region (Credi *et al.*, 2002). BN is present in different areas of the Region, while only few vines infected by a 16SrIII phytoplasma had been found (Romanazzi *et al.*, 2004). The aim of the present investigation was a survey of grapevine yellows in commercial vineyards and cultivar collections of Marche region. Molecular analysis were performed by extracting total DNA from leaf veins of plants showing symptoms, that was amplified by nested-PCR, as already reported (Credi *et al.*, 2002; Romanazzi *et al.*, 2004). Reaction products were digested with endonucleases (*TaqI* and *MseI*) for fragment length polymorphism (RFLP) and visualized on polyacrilamide gel stained with silver nitrate. The analysis confirmed the presence of BN in many vineyards of all provinces of the Region, and in the cultivar collections. Moreover, a new location of FD presence was discovered in the municipality of Ripatransone (AP) in a commercial vineyard of “Montepulciano” 30 years old. Similarly to the first finding of FD in this province, the phytoplasma involved resulted to be of the subgroup 16SrV-C.

Key words: Grapevine, Phytoplasmas, Nested-PCR, RFLP.

Lavori citati

- CREDI R., F. TERLIZZI, G. STIMILLI, S. NARDI, R. LAGNESE, 2002. Flavescenza dorata della vite nelle Marche. *L'Informatore Agrario*, **57** (22), 61-63.
- FIRRAO G., C. MARCONE, A. BERTACCINI, 2004. Phytoplasma classification. *Journal of Plant Pathology*, **86** (4), 299.
- 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.
- ROMANAZZI G., S. MUROLO, L. LANDI, M.B. BRANZANTI, O. SILVESTRONI, V. SAVINO., 2004. Giallumi della vite nelle Marche. *Atti Giornate Fitopatologiche*, **2**, 353-358.

DIAGNOSI

Utilizzo della Real Time PCR per la valutazione del fitoplasma del giallume europeo delle drupacee (ESFYP) nel materiale vivaistico	
D. Pignatta, F. Forno, L. Giunchedi, M. Gobber, L. Mattedi, P. Miorelli, C. Poggi Pollini, C. Ratti, E. Ropelato	85
Diagnosi universale e specifica di fitoplasmi in vite, melo ed insetti vettori mediante Real Time PCR	
L. Galetto, D. Bosco, R. Tedeschi, C. Marzachi	89
Sonde a nanobiotrasduttori per la diagnosi del fitoplasma agente della flavescenza dorata	
M. Moretti, G. Firrao	93
Sviluppo di nuovi metodi Real Time PCR per l'identificazione della flavescenza dorata associata ai giallumi della vite	
E. Angelini, G. Bianchi, C. Morassutti, L. Filippin, M. Borgo	97
Perché è così difficile osservare al microscopio elettronico i fitoplasmi della vite?	
F. Faoro	99

**UTILIZZO DELLA REAL TIME PCR PER LA VALUTAZIONE
DEL FITOPLASMA DEL GIALLUME EUROPEO DELLE
DRUPACEE (ESFYP) NEL MATERIALE VIVAISTICO**

**D. Pignatta¹, F. Forno², L. Giunchedi¹,
M. Gobber³, L. Mattedi², P. Miorelli³,
C. Poggi Pollini¹, C. Ratti¹, E. Ropelato⁴**

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

²Istituto Agrario San Michele all'Adige,
Via Mach 1, I-38010 San Michele all'Adige (TN)

³Istituto Agrario di S. Michele all'Adige,
Centro di Assistenza Tecnica, Via Minch, 1, I-38070 Sarche (TN)

⁴Cooperativa S. Orsola, loc. Zivignago, Via Lagorai, 131,
I-38057 Pergine Valsugana (TN)

Il potenziale epidemico del giallume europeo delle drupacee in impianti di varie drupacee è molto elevato, tanto che negli impianti di albicocco il numero delle piante infette può raddoppiare in pochi anni (Ramel e Gugerli, 2004).

Recentemente è stato messo a punto per la diagnosi del fitoplasma degli scopazzi del melo un metodo di real time PCR che unisce all'elevata sensibilità e specificità, la possibilità di essere utilizzato per saggi massali (Baric e Dalla Via, 2004). La messa a punto del metodo real time PCR per la diagnosi di ESFYP è stata effettuata utilizzando drupacee e pomacee, infette rispettivamente con il giallume europeo delle drupacee, la moria del pero e gli scopazzi del melo, con una procedura che consente la simultanea e specifica amplificazione sia di un frammento del gene per l'RNA ribosomale 16S del patogeno che di un gene della pianta ospite, come controllo della efficienza della reazione (Baric e Dalla Via, 2004). Le prove effettuate hanno dimostrato che la combinazione primer/sonda utilizzata (qAP-16S-F/qAP-16S-R + sonda qESFY-16S) consente la diagnosi di ESFYP in maniera specifica ed affidabile, con una sensibilità 10 volte superiore a quella ottenibile utilizzando la determinazione immunoenzimatica dei prodotti amplificati con una sonda specifica per ESFYP (PCR-ELISA) (Poggi Pollini *et al.*, 2001).

Il forte incremento della malattia riscontrato negli ultimi anni anche in impianti di albicocco situati in provincia di Trento, ha suggerito come forma di contenimento la realizzazione di 5 impianti sperimentali, delle cv. Bergeron e Goldrich, innestate su "Wavit" e "Mirabolano 29C", con materiale vivaistico esente da ESFYP e di effettuare un monitoraggio costante della presenza del vettore, lo psillide *Cacopsylla pruni*, e di piante spontanee infette, in prossimità degli impianti.

L'estrazione del DNA totale (Poggi Pollini *et al.*, 2004) e la real time PCR sono state effettuate sui seguenti campioni:

- radici (3 per campione) da 123 piante, rappresentanti il 15,3% del materiale vivaistico;
- gruppi di *C. pruni* (2 insetti per gruppo), raccolti vicino agli impianti sperimentali;
- 30 campioni singoli da albicocchi infetti in campo (20 campioni), o sani (10) mantenuti in serra.

ESFYP è stato reperito solo nelle piante infette raccolte in campo e in circa la metà dei gruppi di insetti raccolti in diverse località, ma non è mai stato riscontrato nel materiale vivaistico, né negli albicocchi sani. I risultati ottenuti suggerirebbero come l'incremento progressivo dell'infezione negli albicocchi possa essere dovuta più alla trasmissione del fitoplasma da parte di *C. pruni* che all'introduzione di materiale vivaistico infetto. Sono in corso ulteriori ricerche per individuare nelle vicinanze degli impianti sperimentali eventuali drupacee spontanee infette da ESFYP che possano fungere da fonti d'inoculo.

Parole chiave: Real time PCR, Giallume europeo delle drupacee, Materiale vivaistico.

Summary

A real time PCR assay for the detection of European Stone Fruit Yellow Phytoplasma (ESFYP) in plant propagation material

The potential epidemic threat posed by ESFYP in stone fruit orchards is confirmed by the annual progression of the infected trees. In apricot orchards the number of infected trees can double in few years (Ramel and Gugerli, 2004). Recently a real time PCR assay was developed for the detection of apple proliferation phytoplasma, combining high sensitivity and high specificity and suitable for high throughput testing (Baric and Dalla Via, 2004). The real time PCR procedure for the detection of ESFYP was set up using apple, pear and stone fruit trees naturally infected by different phytoplasmas (Apple Proliferation, ESFY and Pear Decline) with a multiplex assay where host and pathogen DNA can be amplified simultaneously to distinguish between uninfected plant material and false-negative results due to PCR inhibition (Baric and Dalla Via, 2004). The results obtained indicate that the primer/probe set used (qAP-16S-F/qAP-16S-R + probe qESFY-16S) allows reliable and specific detection of ESFYP. The tests performed to check the sensitivity demonstrated that this assay is 10 times more sensitive than ESFYP-specific immunoenzymatic detection of PCR products (PCR-ELISA) (Poggi Pollini *et al.*, 2004). ESFY progression was also noted in apricot orchards located in the province of Trento and suggested an attempt to prevent the disease spreading either by planting ESFYP-free material, cv. Bergeron

and Goldrich grafted on “Wavit” or “Myrobalan 29C”, in five experimental orchards and by monitoring the presence of ESFYF-vector, the psyllid *Cacopsylla pruni*, as well as wild reservoirs of the phytoplasma.

Total DNA extraction (Poggi Pollini *et al.*, 2004) and real time PCR assays were performed on:

- root samples from 123 individual plants (3 roots each sample), representing 15,3 % of the propagation material;
- groups of *C. pruni* (2 insects per group), collected in the vicinity of the experimental orchards;
- 30 individual samples from infected (20) and healthy (10) apricots.

ESFYF was detected only in all the infected apricot trees and in almost 50% of the insect groups collected in different locations. No phytoplasmas were found in the healthy plants or in the propagation material. This result suggested that newly infected trees were infected on site by vectors rather than the result of contaminated propagation material. Other research is in progress to check the presence of ESFYF-sources in wild plants in the proximity of the experimental orchards.

Key words: Real time PCR, European Stone Fruit Yellow, Propagation material.

Lavori citati

- BARIC S., J. DALLA VIA, 2004. A new approach to apple proliferation detection: a highly sensitive real-time assay. *Journal of Microbiological Methods*, **57**, 135-145.
- POGGI POLLINI C., R. BISSANI, L. GIUNCHEDI, 2001. Occurrence of European stone fruit yellows phytoplasmas (ESFYF) infection in peach orchards in Northern-Central Italy. *Journal of Phytopathology*, **149**, 725-730.
- POGGI POLLINI C., R. BISSANI, L. GIUNCHEDI, D. DRADI, N. MORI, T. VISIGALLI, 2004. Detection of European Stone Fruit Yellows Phytoplasma (ESFYF) in *Homoptera* insects and in wild stone fruit trees collected in peach orchards in Northern Italy. *Acta Horticulturae*, **657**, 513-518.
- RAMEL M.E., P. GURGELI, 2004. Epidemiological survey of European Stone Fruit Yellows Phytoplasma in two orchards in Western Switzerland. *Acta Horticulturae*, **657**, 459-463.

Lavoro svolto nell'ambito del Progetto Pluriennale: “Sviluppo di tecnologie finalizzate alla valorizzazione delle produzioni vegetali funzionali”- Resp: Prof. Luciano Giunchedi.

Autore di riferimento: Carlo Poggi Pollini Tel. 051-2096725 - e-mail: giunched@agrsci.unibo.it

**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

**SONDE A NANOBIOTRASDUTTORI PER LA DIAGNOSI
DEL FITOPLASMA AGENTE DELLA
FLAVESCENZA DORATA.**

M. Moretti, G. Firrao

Dipartimento di Biologia Applicata alla Difesa delle Piante,
Università di Udine, Via delle Scienze, 208, I-33100 Udine

Molecole biologiche legate a particelle d'oro di dimensioni nanometriche costituiscono nuovi strumenti diagnostici denominati nanobiotrasduttori. Una sonda oligonucleotidica fluoresceinata all'estremità 5' è legata chimicamente a una particella d'oro di 2-4 nm mediante un gruppo sulfidrilico presente all'estremità 3'. L'ibrido bio-inorganico assume spontaneamente una conformazione ad arco, poiché la molecola fluorescente presente sul ssDNA si adsorbe sulla superficie della nanoparticella d'oro. In questa condizione di riposo si rileva una fluorescenza trascurabile poiché vi è un trasferimento energetico dal fluoroforo all'oro, che estingue il segnale (Maxwell *et al.*, 2002). L'inattivazione di questo effetto estintivo, determinata dall'allontanamento del fluoroforo dalla nanoparticella, ripristina l'emissione di fluorescenza. La molecola biologica del costrutto è una sonda oligonucleotidica progettata specificamente: quando la sequenza bersaglio incontra il nanobiotrasduttore, avviene l'ibridazione dei due filamenti complementari, la conformazione ad arco è persa grazie alla rigidità del doppio filamento di DNA e il segnale di fluorescenza può essere rilevato. Il vantaggio rispetto alla tecnica convenzionale che si basa sui "molecular beacons" è che non vi sono limitazioni nella composizione della sequenza della sonda, dato che è la particella d'oro stessa a garantire la formazione della struttura ad arco e di conseguenza l'effetto di estinzione sul fluoroforo. In questo lavoro la sonda bio-inorganica è stata utilizzata per confermare l'identità delle sequenze amplificate in reazione a catena della polimerasi di DNA estratto da piante di vite affette da flavescenza dorata. I sintomi di questa malattia, largamente diffusa in Europa, sono facilmente confusi con quelli di altri giallumi della vite. Attualmente la diagnosi del fitoplasma agente della malattia è basata su PCR nested su un DNA bersaglio specifico (Daire *et al.*, 1997) o su un frammento del gene 16S rDNA (Bertaccini *et al.*, 1995). I frammenti amplificati sono controllati tramite digestione con endonucleasi e/o elettroforesi in gel di agarosio. Il prodotto amplificato può essere rilevato anche mediante ibridazione su supporto solido (dot-blot) a specifici oligonucleotidi sonda (Firrao *et al.*, 1999). Questo lavoro è stato effettuato in sostituzione al suddetto metodo di ibridazione per verificare l'applicabilità della tecnica a nanobiotrasduttori su prodotti di amplificazione a doppio filamento. Specificamente, 20 campioni di DNA estratti da viti infette da fitoplasma sono stati amplificati in PCR con i primer R16F2/R16R2 (Lee *et al.*, 1993). Una seconda PCR è stata eseguita sul

prodotto ottenuto con i primer R16(V)F1/R16(V)R1 (Lee *et al.*, 1994). I nanobiotrasduttori specifici per il fitoplasma della flavescenza dorata sono stati aggiunti alla reazione: con l'ausilio di un termociclatore per "PCR real time", sono state effettuate misurazioni in fluorescenza durante riscaldamento e lento raffreddamento della soluzione. I risultati sono stati confrontati con quelli ottenuti dall'ibridazione su supporto solido. Analogo procedimento, con risultati preliminari incoraggianti, è stato applicato al DNA amplificato con i primer fU3/rU5 (Lorenz *et al.*, 1995), specifici per fitoplasmici generici e valutato direttamente con i medesimi nanobiotrasduttori.

Il metodo qui valutato fornisce alcuni vantaggi rispetto alla tecnica classica ritenuta macchinosa e dispendiosa in termini di tempo: questo approccio, infatti, consente di evitare il passaggio di eliminazione delle sonde non reagite e di non impiegare il supporto solido per fissare gli oligonucleotidi. Risulta vantaggioso anche in confronto alla tecnica di "PCR real time", rispetto alla quale ha costi inferiori e maggiore flessibilità.

Parole chiave: Nanoparticelle, Fluorescenza, Diagnosi, DNA.

Summary

Nanobiotransducers probe for the detection of the Flavescence dorée phytoplasma

Fluorescent biomolecules linked to nanosized gold particles are novel diagnostic tools named nanobiotransducers. An oligonucleotide probe carrying a 5'-fluorophore is chemically bound to a 2 - 4 nm gold particle through a 3'-thiol group. The bio-inorganic hybrid spontaneously assemble in an arch like conformation, because the fluorescent dye on the ssDNA adsorbs on the surface of the gold nanoparticle. In this rest condition, negligible fluorescence can be detected as gold acts as a quencher on the dye (Maxwell *et al.*, 2002). Inactivation of the quenching effect restores fluorescence emission. The biological molecule of the hybrid construct is a specifically designed oligonucleotide probe: when target sequence encounter the nanobiotransducer, hybridization of the two complementary strands occurs, arch like conformation is lost due to the rigidity of the dsDNA formed, and fluorescence signal can be detected. The advantage over conventional molecular beacon technique is that no sequence constrain is required because the gold nanoparticle assures arch like conformation and hence the quenching effect. In this work the probe molecule is used to confirm the identity of sequences amplified in polymerase chain reaction of DNA extracted from grapevine plants affected by Flavescence Dorée. Symptoms of this disease, widespread in Europe, are easily confused with those of other

grapevine yellows. At present phytoplasma detection is based on nested PCR of either a specific target DNA (Daire *et al.*, 1997) or a fragment of the 16S rDNA gene (Bertaccini *et al.*, 1995). Amplicons are then checked by restriction endonuclease digestion and/or gel electrophoresis. Amplification product can be detected also by dot-blot hybridization to an oligonucleotide probe (Firrao *et al.*, 1999). This work was carried out in substitution of the above-mentioned hybridization method to assess the effectiveness of nanobiotransducers technique. In this work 20 samples of DNA extracted from phytoplasma infected grapevines were PCR amplified using primers R16F2/R16R2 (Lee *et al.*, 1993). Nested PCR was performed with primers R16(V)F1/R16(V)R1 (Lee *et al.*, 1994). The FD phytoplasma specific nanobiotransducers were then added to the reaction, which was heated, measured in fluorescence, cooled and measured again. The results were compared with those obtained by dot-blot hybridization. A procedure without nested PCR was also evaluated with preliminary, encouraging results: the DNA was amplified with generic phytoplasma specific primers fU5/rU3 (Lorenz *et al.*, 1995) and then directly evaluated with the FD specific nanobiotransducer.

The method evaluated here provide some advantage over classical technology which are believed to be cumbersome and time consuming, as in this approach no wash out of the probes and no solid support to hold the nucleic acid probes are included; it compares favourably with real time PCR for the lower cost and higher flexibility.

Key words: Self assembled nanoparticles, Fluorescence, Diagnosis, DNA.

Lavori citati

- BERTACCINI A., M. VIBIO, E. STEFANI, 1995. Detection and molecular characterization of phytoplasmas infecting grapevine in Liguria (Italy). *Phytopathologia mediterranea*, **34**, 137-141.
- DAIRE X., CLAIR D., E. BOUDON-PADIEU, 1997. Detection and differentiation of grapevine yellows phytoplasmas belonging to the elm yellows group and to the stolbur subgroup by PCR amplification of non-ribosomal DNA. *European Journal of Plant Pathology*, **103**, 507-514.
- FIRRAO G., S. PALMANO, G. MALOSSINI, I. TOMADA, A. CARPANELLI, M. DAZZAN, C. FRAUSIN, 1999. Monitoring grapevine yellows in North-Eastern Italy. *Journal of Plant Pathology*, **82**, 73.
- LEE I.-M., R.W. HAMMOND, R.E. DAVIS, D.E. GUNDERSEN-RINDAL, 1993. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology*, **83**, 834-842.

- LEE I.-M., D.E. GUNDERSEN-RINDAL, R.W. HAMMOND, R.E. DAVIS, 1994. Use of mycoplasma-like organism (MLO) group specific oligonucleotide primers for nested-PCR assay to detect mixed-MLO infections in a single host plant. *Phytopathology*, **84**, 559-566.
- MAXWELL D.J., J.R. TAYLOR, S. NIE, 2002. Self-assembled nanoparticle probes for recognition and detection of biomolecules. *Journal of the American Chemical Society*, **124**, 9606-9612.
- LORENZ K.-H., B. SCHNEIDER, U. AHREN, E. SEEMÜLLER 1995. Detection of the apple proliferation and pear decline phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and nonribosomal DNA. *Phytopathology*, **85**, 771-776.

Autore di riferimento: Manola Moretti - e-mail: manola.moretti@uniud.it

**SVILUPPO DI NUOVI METODI REAL TIME PCR PER
L'IDENTIFICAZIONE DEI FITOPLASMI ASSOCIATI
AI GIALLUMI DELLA VITE**

**E. Angelini¹, G. Bianchi², C. Morassutti²,
L. Filippin¹, M. Borgo¹**

¹C.R.A. - Istituto Sperimentale per la Viticoltura,
Viale XXVIII Aprile, 26, I-31015 Conegliano (TV)
²ERSA - Agenzia Regionale per lo Sviluppo Rurale
Via Sabbatini, 5, I-33050 Pozzuolo del Friuli (UD)

I metodi molecolari generalmente utilizzati per la diagnosi di fitoplasmi in vite sono di tipo PCR/RFLP e nested PCR. Scarsi sono ancora i lavori che riportano applicazioni delle nuove tecniche di Real Time PCR (Walker, 2002) per i giallumi della vite (Bianco *et al.*, 2004). In questo lavoro sono descritti nuovi metodi per la diagnosi dei fitoplasmi associati ai giallumi della vite attraverso la tecnica innovativa di Real Time PCR.

Sulla base delle sequenze della regione 16Sr del DNA ribosomico fitoplasmale sono stati sviluppati tre sistemi Real Time PCR con sonde tipo TaqMan, per l'identificazione diretta dei fitoplasmi associati a Flavescenza dorata (FD), a Legno nero (BN) ed al Giallume dell'astro (AY). È stato inoltre sviluppato un saggio Real Time PCR con sonde TaqMan anche per un gene della vite, codificante per la chaperonina 21 del cloroplasto, utile come controllo interno della qualità del DNA dei campioni da saggiare e necessario per la verifica della presenza di molecole che possono inibire la PCR.

Con le nuove tecniche di analisi sviluppate è stato possibile identificare in maniera specifica e rapida, tramite amplificazione diretta del DNA, i fitoplasmi presenti in diversi campioni infetti da FD, BN ed AY, sia su vite che su altre piante, precedentemente saggiati mediante nested PCR.

I risultati ottenuti dimostrano che i protocolli Real Time PCR messi a punto e applicati per la diagnostica molecolare dei fitoplasmi sono vantaggiosi rispetto ai metodi PCR tradizionali, in quanto permettono di abbreviare i tempi dell'analisi e di ridurre il rischio di contaminazione, dato che il campione viene manipolato in misura minore.

I nuovi protocolli costituiscono un miglioramento dei metodi analitici attualmente a disposizione e rappresentano una valida procedura diagnostica utile nei programmi di controllo e di certificazione.

Parole chiave: Real Time PCR, Fitoplasmi, Vite, Diagnosi.

Summary

Development of new Real Time PCR methods for the identification of phytoplasmas associated with grapevine yellows

Molecular methods generally used for the diagnosis of grapevine yellows phytoplasmas are PCR/RFLP techniques with nested PCR. Only some few papers report application of *Real Time PCR* methods (Walker, 2002) for the identification of grapevine yellows (Bianco *et al.*, 2004). In this work new analytical methods for the diagnosis of grapevine yellows phytoplasmas by means of the innovative technique Real Time PCR are described.

Three Real Time PCR systems for direct detection of grapevine yellows associated to Flavescence dorée (FD), Bois Noir (BN) and Aster Yellows (AY) phytoplasmas were developed, using TaqMan probes designed on the phytoplasmal 16Sr DNA ribosomal sequences. Moreover, a Real Time PCR assay, using TaqMan probes as well and targeting grapevine gene encoding for chloroplast chaperonin 21, was developed in order to check the DNA quality and to verify the absence of PCR inhibition.

Phytoplasma Real Time PCR detection was performed by direct and fast DNA amplification on several samples previously analyzed by nested-PCR approach. The novel Real Time PCR protocol allowed the detection of FD, BN and AY phytoplasma DNA on infected grapevines and other plants in a very specific manner.

The results show that Real Time PCR approach for phytodiagnostic purposes is more advantageous than conventional PCR methods as regards the rapidity of the assay and the reduced risk of sample cross contamination, due to a minor manipulation of the samples.

These new protocols represent an improvement of existing analytical method and are a reliable diagnostic procedure in certification and control programs.

Key words: Real Time PCR, Phytoplasma, Grapevine, Diagnosis.

Lavori citati

- WALKER, N.J., 2002. A technique whose time has come. *Science*, **296**, 557-559.
BIANCO P.A., P. CASATI, N. MARZILIANO, 2004. Detection of phytoplasma associated with grapevine Flavescence dorée disease using *real-time* PCR. *Journal of Plant Pathology*, **86**, 259-264.

Autore di riferimento: Elisa Angelini - e-mail: elisa.angelini@ispervit.it

PERCHÈ È COSÌ DIFFICILE OSSERVARE AL MICROSCOPIO ELETTRONICO I FITOPLASMI DELLA VITE?

F. Faoro

CNR - Istituto di Virologia Vegetale, Sezione di Milano,
Via Celoria, 2, I-20133 Milano

Fin dal momento della scoperta dei fitoplasmi associati alla flavescenza dorata (FD) e ad altri giallumi della vite, molti sforzi sono stati compiuti negli anni 70-80, in molti laboratori, incluso il nostro, per visualizzare questi procarioti nel floema delle viti infette, mediante la microscopia elettronica a trasmissione. Tuttavia, solo molto più tardi sono state pubblicate alcune microfotografie del floema di vite con organismi simili ai fitoplasmi (Granata e Grimaldi, 1991; Meignoz *et al.*, 1992; Credi, 1994), e alcune di queste non completamente convincenti. In quegli anni quindi la presenza dei fitoplasmi nella vite era più che altro una questione di fede, sostenuta dalla prova indiretta che essi potevano essere trasmessi dall'insetto vettore a piante erbacee, dove erano più facilmente localizzabili. Successivamente, negli anni 90, i biologi molecolari provarono che questi procarioti, non solo erano rilevabili nelle viti infette, ma che specie diverse di essi potevano contemporaneamente infettare la stessa pianta. Questo ha aperto un interessante dibattito sul ruolo delle varie specie di fitoplasmi nell'eziologia dei giallumi della vite. La biologia molecolare ha reso quindi inutili le indagini al microscopio elettronico, che infatti sono, almeno apparentemente, cessate. Tuttavia, la grave epidemia di FD verificatasi in Nord Italia negli ultimi anni, e la conseguente abbondanza di materiale infetto con sintomi eclatanti, ci ha dato l'opportunità di effettuare un ulteriore sforzo nel tentativo di visualizzare i fitoplasmi direttamente nelle viti.

Per aumentare le probabilità di successo, si è deciso di esaminare in sezione sottile tutte le cellule del floema della nervatura principale di foglie di vite cv. Barbera e Cabernet con sintomatologia tipica e nelle quali erano stati riscontrati, mediante PCR, fitoplasmi del tipo V (Casati, comunicazione personale). Allo scopo, la nervatura era tagliata trasversalmente in porzioni di 1 mm di spessore, che venivano fissate convenzionalmente in una miscela di formaldeide e glutaraldeide, post-fissate in osmio ed incluse in resina di Spurr. Quattro sezioni dello spessore di 10 μm dell'intera nervatura erano poi tagliate serialmente ed incollate con un sottilissimo velo di cianoacrilato su blocchi di resina pura. Da ciascuno dei quattro blocchi veniva allestita una piramide che includesse un diverso quarto dell'intero floema. In questo modo le sezioni ultrasottili tagliate dai diversi blocchi includevano l'intera area del floema. Le osservazioni ultrastrutturali rivelavano la presenza di fitoplasmi in sole 2-3 delle circa duemila cellule costituenti la nervatura della foglia di Barbera in esame, mentre nella cv. Cabernet, solo una cellula risultava

visibilmente infetta, nonostante che la dimensione del floema fosse simile. La morfologia dei fitoplasmi era quella tipica, già osservata in molte altre specie, seppur, in apparenza, maggiormente pleomorfica. Nessun'altra alterazione ultrastrutturale era evidenziabile, fatta eccezione per la presenza di gruppi di cellule floematiche completamente collassate.

Questi dati, oltre che spiegare come sia quasi impossibile visualizzare i fitoplasmi della vite esaminando solo porzioni di floema, come avviene normalmente nelle indagini ultrastrutturali, sostengono indirettamente l'opinione emergente che la severità dei sintomi della malattia non sia dovuta alle alterazioni anatomiche del floema, ma all'interazione con i geni della pianta, particolarmente quelli coinvolti nell'accumulo e traslocazione dei carboidrati (Bertamini *et al.*, 2002; Jagoueix *et al.*, 2001).

Parole chiave: Fitoplasmi vite, TEM.

Summary

Why do grapevine phytoplasmas escape electron microscopists?

Since the discovery of phytoplasmas associated with Flavescence dorée (FD) and other grapevine yellows, several attempts have been made throughout seventies and eighties in many laboratories, including ours, to observe these prokaryotes in the phloem of infected grapevines. Nevertheless, only at the beginning of nineties some transmission electron micrographs of phytoplasma-like organisms were published (Granata e Grimaldi, 1991; Meignoz *et al.*, 1992; Credi, 1994), some of them not entirely convincing. Thus, the presence of phytoplasmas in grapevine in those years was essentially a matter of faith, only supported by the indirect proof that they could be transmitted by leafhoppers to herbaceous hosts. More recently, molecular biologists proved that these Mollicutes were not only present in all the infected plants, but also that different phytoplasma genotypes could be found in the same diseased grapevine, opening interesting debates on their etiological role in grapevine yellows. The advent of molecular biology, with its potentialities, made the efforts of electron microscopists useless and this kind of investigation ceased. However, the outbreak of FD in the last few years in Northern Italy and the consequent abundance of infected plants with severe symptoms gave us the opportunity for a "last attempt" to see how grapevine phytoplasmas look like.

At this purpose it was decided to examine, in thin sections, all phloem cells from leaf main veins, excised from Cabernet and Barbera plants showing severe FD symptoms and containing type V phytoplasmas, as assessed by

PCR (Casati, personal communication). Veins were cross cut in 1 mm thick section, conventionally fixed in a mixture of 3% paraformaldehyde +3% glutaraldehyde, postfixed in osmium tetroxide and embedded in Spurr's resin. Four 10 μ m thick sections of the whole vein were serially cut from each block and immediately stacked with a very small amount of cianoacrylate (to avoid section undulation) on the top of resin blocks. From each of the four block a pyramid was obtained, including a different section quarter of the vein. In this way, thin sections cut from the 4 pyramids included the whole phloem area. Ultrastructural observations revealed at last the presence of phytoplasmas with their typical morphology, in only two-three cells out of the two thousand present in the Barbera examined vein, and just in one of Cabernet vein. The ultrastructural details of the Mollicutes were similar of those previously observed in many other species, though they appeared highly pleomorphic. No other appreciable ultrastructural alterations were observed in the infected veins, in comparison with veins of the same size coming from healthy leaves, except for the presence of numerous collapsed phloem cells.

These data, besides confirming that the chance of finding phytoplasmas in grapevine while examining thin sections of phloem portions are almost nil, support the emerging opinion that symptom severity of the disease is not due to phloem anatomical alterations and/or obliterations, but to the interaction with plant genes, particularly those involved in carbohydrate synthesis and translocation (Bertamini *et al.*, 2002; Jagoueix *et al.*, 2001).

Key words: Grapevine phytoplasmas, TEM.

Lavori citati

- BERTAMINI M., N. NEDUNCHEZHIAN, F. TAMOSI, M.S. GRANDO, 2002. Phytoplasma [Stolbur-subgroup (Bois Noir-BN)] infection inhibits photosynthetic pigments ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase and photosynthetic activities in field grown grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay). *Leaves*, **61**, 357-366.
- CREDI R., 1994. Mycoplasma-like Organisms Associated with Grapevine Yellows Disease Occuring in Italy. *Journal of Phytopathology*, **141**, 113-120.
- GRANATA G., V. GRIMALDI, 1991. Electron microscopic detection of mycoplasma-like organisms in epidemic yellow affected grapevine. *Petria*, **1**, 171-175.
- JAGOEIX-ÈVEILLARD S., F. TARENDEAU, K. GUOLTER, J.L. DANET, J. M. BOVÈ, M. GARNIER, 2001. *Catharanthus roseus* genes regulated differentially by mollicute infections. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **14**, 225-233.
- MEIGNOZ R., E. BOUDON-PADIEU, J. LARRUE, A. CAUDWELL, 1992. Flavescence dorée de la Vigne. Présence de MLO et Effets Cytopathogènes Associés, dans le Liber de la Vigne. *Jorunal of Phytopathology*, **134**, 1-9.

CARATTERIZZAZIONE

Diffusione e caratterizzazione di sottotipi di “<i>Candidatus Phytoplasma mali</i>” in diverse zone vocate alla melicoltura	
M. Martini, P. Ermacora, D. Delić, S. Moruzzi, N. Loi, L. Carraro	105
Individuazione e caratterizzazione di fitoplasmi della vite in Calabria	
G. Albanese, G. Pasquini, R. Sciarroni, L. Ferretti, R. La Rosa	109
Caratterizzazione di fitoplasmi associati al legno nero (LN) della vite in Liguria, Piemonte, Sardegna, Sicilia e Valle d’Aosta	
Pacifico, A. Alma, M. Tessitori, R. Tedeschi, C. Marzachì	113
Caratterizzazione molecolare di isolati di legno nero nell’Italia centrale e meridionale	
G. Pasquini, L. Ferretti, G. Albanese, M. Barba	115
Variabilità molecolare di fitoplasmi 16SrXII in vigneti delle province di Modena e Reggio Emilia	
S. Botti, S. Paltrinieri, N. Mori, L. Milanese, R. Bondavalli, A. Bertaccini	121

**DIFFUSIONE E CARATTERIZZAZIONE DI SOTTOTIPI DI
'CANDIDATUS PHYTOPLASMA MALI' IN DIVERSE ZONE
VOCATE ALLA MELICOLTURA**

**M. Martini¹, P. Ermacora¹, D. Delic²,
S. Moruzzi¹, N. Loi¹, L. Carraro¹**

¹Dipartimento di Biologia Applicata alla Difesa delle Piante,
Università di Udine, Via delle Scienze, 208, I-33100 Udine

²Istituto Agronomico Mediterraneo, Via Ceglie, 9,
I-70010 Valenzano (Bari)

Nel presente lavoro si riporta la diffusione di sottotipi di '*Candidatus* Phytoplasma mali' ('*Ca. P. mali*') in diversi areali coltivati a melo nel Sud-Est Europa. Sia meli, che insetti vettori naturali della fitoplasmosi, *Cacopsylla costalis* e *C. melanoneura*, sono stati analizzati per la presenza di sottotipi di '*Ca. P. mali*'.

I campioni di melo sono stati saggiati mediante le tecniche DAPI, ELISA, Immunofluorescenza (Loi *et al.*, 2002) e PCR/RFLP, mentre gli insetti solo mediante analisi PCR/RFLP. Sono state adottate due metodiche PCR/RFLP: il metodo descritto da Jarausch *et al.*, (2000), basato sull'amplificazione di un frammento di DNA non ribosomale, in grado di distinguere i sottotipi AP, AT-1, AT-2; il metodo messo a punto di recente (Martini, dati non pubblicati), basato sull'amplificazione dei geni *rpl22* ed *rps3* codificanti per le proteine ribosomali (rp). In questo caso, sono stati impiegati i primers rpAP15f/rpAP15r specifici per '*Ca. P. mali*'; questo metodo consente, mediante digestione enzimatica con *AluI* degli amplificati, di distinguere quattro sottotipi di '*Ca. P. mali*', indicati con rpX-A, rpX-B, rpX-C e rpX-D.

Nel corso del 2004, sono stati effettuati monitoraggi in 3 zone melicole della regione Friuli Venezia Giulia (FVG), per un totale di 40 campioni di foglie raccolte da meli sintomatici, ed in 5 località della Bosnia-Erzegovina (BiH), per un totale di 22 campioni di foglie da meli sintomatici. Sono stati inoltre saggiati due campioni di melo provenienti dalla Grecia. *C. costalis* e *C. melanoneura* sono state catturate sia in FVG che in BiH, nelle stesse località di campionamento dei meli. Come riferimento sono state utilizzate pervinche infette con gli isolati AP15 ed AT. Con le due procedure di PCR/RFLP adottate, tali isolati sono risultati appartenere ai sottotipi AP/rpX-A e AT-1/rpX-B; entrambi vengono riconosciuti dagli anticorpi monoclonali, con una reazione maggiore per AP15. In FVG sono stati identificati i seguenti sottotipi di '*Ca. P. mali*': AP/rpX-A (24 campioni); AT-2/rpX-A (9 campioni); AT-1/rpX-D (6 campioni); AT-1/rpX-C (1 campione). In BiH i sottotipi di '*Ca. P. mali*' identificati sono stati: AP/rpX-A (13 campioni); AT-2/rpX-A (6 campioni); AT-1/rpX-A (2 campioni) e AT-1/rpX-B (1 campione). In entrambi i campioni provenienti dalla Grecia il sottotipo di '*Ca. P. mali*' identificato è stato AP/rpX-A.

Utilizzando le tecniche sierologiche ELISA ed Immunofluorescenza, i sottotipi AP/rpX-A e AT-2/rpX-A hanno sempre dato reazione positiva; mentre i sottotipi AT-1/rpX-C, AT-1/rpX-D non hanno dato reazione. La caratterizzazione sierologica dei sottotipi AT-1/rpX-A e AT-1/rpX-B è in corso.

Risultati preliminari sugli insetti vettori hanno dimostrato la presenza degli stessi sottotipi di '*Ca. P. mali*' trovati nei meli provenienti dalle medesime località.

Parole chiave: Fitoplasma, Apple proliferation, *Cacopsylla costalis*, *Cacopsylla melanoneura*.

Summary

Spreading and characterization of '*Candidatus Phytoplasma mali*' subtypes in different apple growing areas

The present work describes the presence of '*Candidatus Phytoplasma mali*' ('*Ca. P. mali*') subtypes in different apple growing areas of South-East Europe. Both apple trees and psyllid vectors *Cacopsylla costalis* and *C. melanoneura*, were analysed for the presence of '*Ca. P. mali*' subtypes.

The plants were analysed by using DAPI, ELISA, Immunofluorescence (Loi *et al.*, 2002) and PCR/RFLP techniques, while the insects only by PCR/RFLP analyses. The two PCR/RFLP procedures adopted were: the method described by Jarausch *et al.*, (2000) based on non ribosomal DNA fragment that distinguish the subtypes AP, AT-1, AT-2; the method recently developed (Martini, unpublished), based on ribosomal protein (rp) gene sequences *rpl22* and *rps3*. In this case, primer pair rpAP15f/rpAP15r has been designed and tested for '*Ca. P. mali*' specificity. Rp genes based method permits to distinguish four different '*Ca. P. mali*' subtypes, indicated as rpX-A, rpX-B, rpX-C and rpX-D, by RFLP analysis using *AluI*.

In 2004 extensive surveys were carried out in 3 different apple-growing areas in Friuli Venezia Giulia (FVG) region, for a total of 40 symptomatic leaf samples, and in 5 different locations in Bosnia and Herzegovina (BiH), for a total of 22 symptomatic leaf samples. Two samples from Greece were also tested. The psyllids *C. costalis* and *C. melanoneura* were collected both in FVG and BiH from the same locations where apple trees were sampled. Periwinkles infected with AP15 and AT isolates have been used as reference. With the two adopted PCR/RFLP procedures, these isolates resulted to belong to AP/rpX-A and AT-1/rpX-B subtypes respectively; they reacted positively with monoclonal antibodies, even if AP15 reaction was stronger than AT. In FVG the '*Ca. P. mali*' subtypes identified were: AP/rpX-A (24 samples); AT-2/rpX-A (9 samples); AT-1/rpX-D (6 samples) and AT-1/rpX-C (1 sample). In BiH the '*Ca. P. mali*' subtypes identified were: AP/rpX-A

(13 samples); AT-2/rpX-A (6 samples); AT-1/rpX-A (2 samples) and AT-1/rpX-B (1 sample). In Greece 'Ca. P. mali' subtype identified in both samples was AP/rpX-A.

Using serological analyses, ELISA and Immunofluorescence, the subtypes AP/rpX-A and AT-2/rpX-A reacted positively for the presence of 'Ca. P. mali'; while the subtypes AT-1/rpX-C and AT-1/rpX-D gave negative results. The serological characterization of subtypes AT-1/rpX-A and AT-1/rpX-B is under investigation.

Preliminary results obtained from insect vectors demonstrated the presence of the same 'Ca. P. mali' subtypes found in apple trees from the same locations.

Key words: Phytoplasma, Apple proliferation, *Cacopsylla costalis*, *Cacopsylla melanoneura*.

Lavori citati

- LOI N., P. ERMACORA, L. CARRARO, R. OSLER, T.A. CHEN, 2002. Production of monoclonal antibodies against apple proliferation phytoplasma and their use in serological detection. *European Journal of Plant Pathology*, **108** (1), 81-86.
- JARAUSCH W., C. SAILLARD, B. HELLIOT, M. GARNIER, F. DOSBA, 2000. Genetic variability of apple proliferation phytoplasmas as determined by PCR-RFLP and sequencing of a non-ribosomal fragment. *Molecular and Cellular Probes*, **14**, 17-24.

INDIVIDUAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DI FITOPLASMI DELLA VITE IN CALABRIA

**G. Albanese¹, G. Pasquini², R. Sciarroni^{1,2},
L. Ferretti^{1,2}, R. La Rosa³**

¹Dipartimento di Agrochimica e Agrobiologia,
Università Mediterranea di Reggio Calabria
Piazza S. Francesco di Sales, 4, 89061 Gallina (Reggio Calabria)

²C.R.A. - Istituto Sperimentale per la Patologia Vegetale
Via C.G. Bertero, 22, I-00156 Roma

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

Nell'ambito del progetto MiPAF dal titolo "I giallumi della vite" (GIAVI), è stata avviata un'indagine sui giallumi da fitoplasmi della vite in Calabria. Nel corso dell'estate-autunno 2004 sono stati analizzati cinquantadue campioni di vite, prelevati in 15 vigneti delle Province di Catanzaro, Cosenza, Crotona e Reggio Calabria. I campioni appartenevano a diverse varietà, alcune delle quali (come 'Gaglioppo', 'Greco nero' e 'Magliocco canino') sono le più rappresentate in Calabria. Le piante da cui sono stati effettuati i prelievi, per la maggior parte, presentavano accartocciamenti fogliari accompagnati da arrossamenti (nei vitigni a uva rossa) o ingiallimenti (nei vitigni a uva bianca), necrosi variamente estese delle foglie, e in alcuni casi anche necrosi dei grappoli.

Gli acidi nucleici sono stati estratti dalla nervatura delle foglie mediante un protocollo riportato da Pasquini *et al.*, (2001). Le metodiche utilizzate per l'individuazione e caratterizzazione dei fitoplasmi sono state l'amplificazione genica (PCR) diretta e ripetuta (nested-PCR) seguite dall'analisi del polimorfismo della lunghezza dei frammenti di restrizione (RFLP). Gli oligonucleotidi utilizzati per la PCR diretta sono stati P1/P7 (Schneider *et al.*, 1995) seguiti in nested-PCR da R16(I)F1/R1 (Lee *et al.*, 1994), R16(V)F1/R1 (Lee *et al.*, 1994) oppure M1/B6 (= 758f/m23SR) (per tutti i fitoplasmi) (Gibb *et al.*, 1995; Padovan *et al.*, 1995).

La PCR diretta ha rilevato tra i campioni saggiati solo 4 positivi, mentre le analisi di amplificazione genica ripetuta con R16(I)F1/R1 e M1/B6 hanno evidenziato la presenza di fitoplasmi in 40 campioni. Sui prodotti di amplificazione ottenuti in nested-PCR con M1/B6 è stata effettuata una digestione con l'enzima *TaqI*; l'analisi RFLP degli amplificati digeriti ha consentito di attribuire i fitoplasmi individuati ai gruppi 16SrXII-A (38 campioni) e 16SrI-B (2 campioni).

Parole chiave: Fitoplasmi, Vite, Calabria.

Summary

Detection and characterization of grapevine phytoplasmas in Calabria

In the framework of an Italian research project financed by the Ministry of Agriculture and titled "Grapevine yellows", a survey on grapevine yellows diseases was carried out in Calabria (Italy). Fifty-two samples were collected in late summer and autumn 2004 in grapevine vineyards of Catanzaro, Cosenza, Crotona and Reggio Calabria Provinces. Samples were from various cultivars, some of which are the most diffused in Calabria (as 'Gaglioppo', 'Greco nero' and 'Magliocco canino'). Most of the plants, chosen for sampling, showed symptoms consisting in leaf margin downward rolling and blade reddening (in red-berried cultivars) or yellowing (in white-berried cultivars) coupled, in some cases, with necrosis along the veins or in interveinal sectors and /or desiccated fruit clusters.

Nucleic acids were extracted from main leaf vein by a procedure of Pasquini *et al.* (2001). To identify and characterize phytoplasmas, direct and nested polymerase chain reaction, followed by restriction fragment length polymorfisms (RFLP), were used. Direct PCR was performed with primers P1/P7 (Schneider *et al.*, 1995) followed by nested-PCR with primers R16(I)F1/R1 (Lee *et al.*, 1994), R16(V)F1/R1 (Lee *et al.*, 1994) or M1/B6 (= 758f/m23SR) (Gibb *et al.*, 1995; Padovan *et al.*, 1995).

Out of total tested plants, only 4 were positive in direct PCR, whereas nested-PCR showed the presence of phytoplasmas in 40 samples. *TaqI* RFLP analysis of the amplification products obtained with M1/B6 primers allows to classify identified phytoplasmas to groups 16SrXII-A (38 samples) and 16SrI-B (2 samples).

Key words: Phytoplasmas, Grapevine, Calabria.

Lavori citati

- GIBB K., A. 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 mycoplasma-like organism (MLO) group-specific oligonucleotide primers for nested-PCR assay to detect mixed-MLO infections in a single host plant. *Phytopathology*, **84** (6), 559-566.
- 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 phitoplasmas from Italy. *Australian Journal Grape Wine Research*, **1**, 25-31.

- PASQUINI G., E. ANGELINI, R. BENEDETTI, A. BERTACCINI, L. BERTOTTO, P.A. BIANCO, F. FAGGIOLI, M. MARTINI, C. MARZACHÌ, M. BARBA, 2001. Armonizzazione della diagnosi della flavescenza dorata della vite (FD): risultati di una prova comparativa. *Atti Progetto POM A32*, vol. **II**, 921-947.
- SCHNEIDER B, M.T. COUSIN, S. KLINGKONG, E. SEEMÜLLER, 1995. Taxonomic relatedness and phylogenetic position of phyoplasmas associated with disease of faba bean, sunnhemp, sesame, soybean and eggplant. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, **102**, 225-232.

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

Autore di riferimento: Giuliana Albanese Tel: 0965-689051 - e-mail: galbanese@unire.it

**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.

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

G. Pasquini¹, L. Ferretti^{1,2}, G. Albanese², M. Barba¹

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

²Dipartimento 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 molecolarmente.

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

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. Flavescence 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

Prevenzione e controllo

Individuation of cDNA-AFLP markers in apple proliferation-resistant Malus-rootstocks	
M. Moser, W. Jarausch, E. Seemüller, R. Velasco	127
Controllo di apple proliferation - Scopazzi del melo mediante l'impiego di portainnesti resistenti	
W. Jarausch, C. Bisognin, T. Peccerella, E. Seemüller	129
Attività di alcuni insetticidi nella prevenzione della trasmissione del fitoplasma <i>Chrysanthemum yellows</i> (CY;16Sr-IB)	
P. Saracco, C. Marzachì, D. Bosco	133
Prove di contenimento del legno nero della vite	
N. Mori, L. Milanesi, R. Bondavalli, S. Botti	137
Funghi endofiti della vite con possibile implicazione nel recovery da flavescenza dorata	
R. Musetti, M. Martini, S. Borselli, R. Osler	141
Individuazione e localizzazione di un simbiote "Candidatus <i>Cardinium</i> sp." in organi e tessuti di <i>Scaphoideus titanus</i>, insetto vettore della Flavescenza dorata in <i>Vitis vinifera</i>	
M. Pajoro, M. Marzorati, A. Alma, L. Sacchi, S. Palermo, R. Tedeschi, L. Brusetti, N. Raddadi, F. Quaglino, P. A. Bianco, C. Bandi, D. Daffonchio	145

**INDIVIDUAZIONE DI MARKER cDNA-AFLP IN
PORTAINNESTI DI MELO RESISTENTI AD
APPLE PROLIFERATION (AP)**

**M. Moser¹, W. Jarausch²,
E. Seemüller³, R. Velasco¹**

¹Istituto Agrario San Michele all'Adige,
Via Mach 1, I-38010 San Michele all'Adige (TN)

²Centrum Grüne Gentechnik (CGG), D-67435 Neustadt an der Weinstrasse

³Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft (BBA),
Schwabenheimer Str. 101, D-69221 Dossenheim

I più noti e tipici sintomi della malattia apple proliferation (AP)/scopazzi del melo sono la formazione di scopazzi, una precoce colorazione fogliare in autunno e una diminuzione della dimensione dei frutti. La loro gravità dipende dal tipo di varietà di melo infettata ma in tutti i casi ciò comporta una rilevante perdita economica. Negli ultimi venti anni, in Germania furono selezionati dei genotipi resistenti ad AP. Poiché non vi sono trattamenti curativi per tale malattia, risulta chiara l'importanza di questi genotipi che per contro mostrano però scarse qualità di tipo agronomico. Per introdurre tali caratteristiche, questi genotipi furono incrociati con genotipi di alto valore agronomico. Le nuove generazioni offrono la possibilità di studiare la malattia nel tentativo di comprendere quali meccanismi di resistenza siano coinvolti. L'introduzione di metodi basati sull'analisi del DNA, offre potenti strumenti per questo tipo di studi e tramite lo sviluppo di marcatori genetici permette di accelerare il classico programma di incrocio per l'ottenimento di un nuovo portinnesto resistente alla malattia e allo stesso tempo con adeguate caratteristiche agronomiche.

Per raggiungere questi obiettivi, vennero utilizzati tre genotipi: H0909 (D4551 x M9; resistente), D4551 (*Malus sieboldii* x *Laxton's superb*; resistente) e M9 (non-resistente).

Sui tessuti floematici provenienti dai tre genotipi sani, venne effettuata un'analisi cDNA-AFLP. Nella comparazione dei profili ottenuti, vennero considerate ed isolate solo le bande presenti in entrambi i genotipi resistenti ma non nel non-resistente. Furono individuate 233 bande per ciascun genotipo resistente. Uno svantaggio intrinseco alla tecnica cDNA-AFLP è spesso la presenza in una singola banda, di più di un tipo di frammento cDNA. Per eliminare i prodotti non interessanti, le bande furono ri-amplificate e clonate. Circa 5000 cloni furono prelevati e i prodotti di PCR di ogni clone fu spottato su filtro di membrana di nylon, per la preparazione di un macro-array ad alta densità. 2 differenti set di filtri furono preparati, ognuno con 2500 spot in doppio. Successivamente i filtri vennero ibridati in condizioni di alta stringenza per effettuare uno screening differenziale, usando

sonde marcate con digoxigenina ottenute dai tre genotipi sani. In questo modo fu possibile ridurre il numero di cloni da analizzare poiché furono considerati solo i cloni che mostrarono nella stessa posizione del filtro, un segnale di ibridazione di simile intensità per entrambi i genotipi resistenti ma nessun segnale per il non-resistente. 126 cloni vennero individuati e sequenziati, risultando essere 23 singole sequenze dopo l'analisi di clustering. Queste vennero confrontate contro i database di EST. Un'analisi SNP venne condotta per investigare possibili differenze nelle sequenze genomiche dei tre genotipi. Inoltre furono sviluppati primer specifici dalle sequenze più interessanti, allo scopo di effettuare un'analisi Real-time PCR usando cDNA proveniente da piante sane ed infette dei 3 genotipi, per confrontare i livelli di espressione di questi geni costitutivamente espressi, nelle due differenti condizioni sano/infetto.

Parole chiave: Apple Proliferation, cDNA-AFLP, Screening differenziale.

CONTROLLO DI APPLE PROLIFERATION - SCOPAZZI DEL MELO MEDIANTE L'IMPIEGO DI PORTAINNESTI RESISTENTI

W. Jarausch¹, C. Bisognin², T. Peccerella¹, E. Seemüller³

¹AlPlanta, RLP AgroScience GmbH, Breitenweg 71,
D-67435 Neustadt an der Weinstrasse, Germany

²Istituto Agrario San Michele all'Adige,

Via Mach 1, I-38010 San Michele all'Adige (TN)

³Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft (BBA),
Schwabenheimer Str. 101, D-69221 Dossenheim

Apple proliferation (AP) - scopazzi del melo, è una fitopatologia presente in tutti i paesi del centro e del sud Europa. Un'incidenza particolarmente elevata è riscontrata nella zona frutticola del Trentino dove l'epidemia si è sviluppata a partire dagli anni '90. Nel 2001, è stato finanziato dalla Provincia Autonoma di Trento un progetto interdisciplinare, chiamato SMAP, allo scopo di sviluppare strategie di controllo contro il fitoplasma AP. Poiché, attualmente, tutte le cultivar coltivate e i portainnesti impiegati risultano suscettibili alla malattia, e non sono applicabili trattamenti curativi, due strategie di controllo sono state adottate: una soluzione a breve termine volta al contenimento dell'incremento della malattia trasmessa mediante insetti vettori, e una soluzione a lungo termine consistente nello sviluppo di piante resistenti alla malattia. Poiché i fitoplasmidi di AP sono eliminati ogni anno dalla parte aerea della pianta, durante il rinnovo del tessuto floematico, la strategia vincente adottata è basata sullo sviluppo di portainnesti resistenti alla malattia.

Dal 1980, presso l'istituto sperimentale di Dossenheim, è iniziato uno studio per l'identificazione in campo della resistenza naturale ad AP in genotipi di *Malus* sp. La resistenza naturale è stata trovata in specie apomittiche di melo quali *M. sieboldii* e in selezioni ottenute da incrocio *M. sieboldii* x *M. domestica*. Tuttavia questi genotipi sono troppo vigorosi perché siano usati come portainnesti oltre al fatto che inducono alternanza di produzione nella pianta. Perciò, un nuovo programma di miglioramento genetico è iniziato nel 2001, allo scopo di introdurre il carattere della resistenza in portainnesti di valore agronomico. Tra il 2001 e il 2004, diciannove differenti combinazioni d'incrocio sono state effettuate fra diversi genotipi resistenti e portainnesti derivanti da *Malus domestica* normalmente impiegati (es. M 9). La produzione di frutti e di semi ottenuta varia considerevolmente tra le diverse combinazioni d'incrocio; influenzata dalla compatibilità dei parentali e dal grado d'apomissia di quelli derivanti da *Malus sieboldii*. Più di 3000 semenzali sono stati ottenuti e analizzati con marcatori molecolari microsatelliti (SSR) per individuare i genotipi ricombinanti. Di questi, 1450 semenzali sono stati scelti e inoculati, mediante innesto, con il fitoplasma AP, allo scopo di valutare il carattere della resistenza. Il materiale è stato piantato in vivaio con l'intento di monitorare, in condizioni naturali e per diversi anni, l'espressione dei sin-

tomi e del carattere della resistenza. La risposta dei diversi genotipi varia da morte immediata subito dopo l'infezione, nei genotipi molto suscettibili, alla mancanza di manifestazione di sintomi, nei genotipi resistenti. Due anni dopo l'infezione, le radici delle giovani piantine inoculate sono state analizzate con la PCR per determinarne l'eventuale presenza - assenza del fitoplasma AP. Il fitoplasma è stato riscontrato solo in pochi casi di piante asintomatiche mentre è stato trovato in tutte le piante manifestanti sintomi di AP. È stata effettuata anche un'analisi preliminare mediante RT-PCR per quantificare AP nei differenti genotipi. I primi risultati indicano che il carattere della resistenza può essere ereditato dalla progenie. Una valutazione agronomica dei genotipi resistenti dovrà ora seguire.

Parole chiavi: Scopazzi del melo, Resistenza naturale, Miglioramento genetico.

Summary

Control of apple proliferation disease through the use of resistant rootstocks

Apple proliferation (AP) occurs in all countries of central and southern Europe. A very high incidence occurs in apple growing regions of Trentino where a serious epidemics of AP is developing since the late 1990. Therefore, an interdisciplinary project named SMAP has been started in 2001 to establish control strategies for AP in Trentino. As all actually grown cultivars and rootstocks are susceptible to the disease and no curative treatments are applicable two control strategies were adopted: as a short-term solution the control of the disease spread by insect vectors and as a long-term solution the development of resistant plant material. As AP phytoplasmas are eliminated each year in the upper parts of the tree during renewal of the phloem a successful resistance strategy can be based solely on resistant rootstocks.

Since 1980, an extensive screening for natural resistance in *Malus* genotypes has been carried out at Dossenheim. Natural resistance has been found in the apomictic *Malus* species *M. sieboldii* and in crosses made between *M. sieboldii* x *M. domestica* and related species. However, these genotypes are too vigorous for the use as rootstocks and they induce alternate cropping. Therefore, a new breeding program was started in 2001 to introduce resistance into rootstock material of agronomic value. In the years 2001 - 2004 19 crosses were made between different resistant genotypes and *M. domestica*-rootstock genotypes like M9. Fruit set and seed production varied considerably between the different crosses, depending on the compatibility of the parental genotypes and the degree of apomixis. More than 3000 progeny seedlings were

obtained. These seedlings were screened by microsatellite (SSR) analysis for recombinant genotypes. In total, 1450 progeny seedlings were graft-inoculated with AP phytoplasma in order to evaluate the resistance behaviour. The material was planted in the nursery in order to monitor symptom expression and the resistance under natural conditions for several years. The response of the different progeny genotypes ranged from sudden death of highly susceptible ones to no symptom development in resistant genotypes. Two years after inoculation the roots of the inoculated young plants were analysed by PCR for AP phytoplasma presence. AP phytoplasmas could be detected only in few cases of non-symptomatic plants whereas they were regularly detected in symptomatic ones. A quantitative real-time PCR assay was employed to quantify the AP phytoplasmas in the different genotypes. The preliminary results indicate that the resistance trait can be inherited to the progeny. An agronomic evaluation of the resistant genotypes has now to follow.

Key words: Apple proliferation phytoplasma, Natural resistance, Breeding.

Autore di riferimento : Wolfgang Jarausch - e-mail : wolfgang.jarausch@agrosience.rlp.de

**ATTIVITA' DI ALCUNI INSETTICIDI NELLA PREVENZIONE
DELLA TRASMISSIONE DEL FITOPLASMA
CHRYSANTHEMUM YELLOWS (CY; 16Sr-IB)**

P. Saracco¹, C. Marzachi², D. Bosco¹

¹Di.Va.P.R.A. Entomologia e Zoologia applicate all'Ambiente "Carlo Vidano",
Università di Torino, Via L. da Vinci 44,
I-10095 Grugliasco (TO)

²Istituto di Virologia Vegetale, CNR,
Strada delle Cacce, 73, I-10135 Torino

La difesa dalle fitoplasmosi si basa sulla messa a dimora di materiale di propagazione sano e sulla lotta agli insetti vettori, poichè la lotta diretta contro i fitoplasmi, sensibili soltanto ad antibiotici, non è praticabile. Alcuni insetticidi organofosforati (OPS), fenitrothion, chlorpyrifos ethyl, malathion e il neonicotinoide sistemico imidacloprid sono stati sperimentati in condizioni controllate per verificare la loro attività di protezione delle piante dalla trasmissione di fitoplasmi. Gli insetticidi sperimentati sono OPS utilizzati nella lotta contro il vettore della flavescenza dorata della vite (Mazzoni *et al.*, 2003; Mazio e Montermini, 2004) e un neonicotinoide sistemico di cui è nota l'efficacia nella prevenzione della trasmissione di patogeni da insetti (Wang *et al.*, 1999; Ahmed *et al.*, 2001). Il sistema sperimentale utilizzato consisteva nel fitoplasma *Chrysanthemum yellows* (CY), appartenente al gruppo genetico 16SR-IB, trasmesso dal cicadellide deltocefalino *Macrostelus quadripunctulatus* alla pianta ospite *Chrysanthemum carinatum*. Centoventi piante test sono state trattate alle dosi consigliate con ciascuno dei suddetti insetticidi o con acqua come controllo (per gli OPS sono stati applicati trattamenti fogliari mentre imidacloprid è stato applicato al terreno). 1, 4, 7, 10, 15 e 20 giorni dopo il trattamento 20 gruppi di 5 cicaline infettive (che avevano acquisito CY da almeno 20 giorni) erano isolati su singole piante per l'inoculazione di 2 giorni. Le piante inoculate erano poi mantenute in serra per un mese per l'osservazione dei sintomi dell'infezione. In un secondo esperimento piante infette con CY erano trattate con i suddetti insetticidi (e con acqua come controllo) e 40 giorni dopo su ciascuna di esse erano isolate un centinaio di ninfe *M. quadripunctulatus* per l'acquisizione. Gli insetti sopravvissuti erano trasferiti su avena per l'incubazione e dopo 20 giorni erano impiegati in esperimenti di trasmissione e sottoposti ad estrazione del DNA totale e a PCR per il rilevamento del fitoplasma.

Gli OPS, pur indicando mortalità totale delle cicaline nei primi giorni dopo il trattamento, riducevano in misura assai modesta (tra il 20 e il 50% ad 1 giorno e tra 0 e 30% a 4 giorni) la trasmissione di CY. Successivamente l'attività di protezione era praticamente nulla. Diversamente, nelle piante trattate con imidacloprid la

percentuale di infezione risultava inferiore del 70% rispetto al controllo, indipendentemente dal tempo trascorso dal trattamento. Le piante non trattate risultavano tutte infette. Il secondo esperimento ha mostrato che a 40 giorni dal trattamento le cicaline sopravvivevano, seppur in misura ridotta, soltanto sulle piante trattate con OPS. Le cicaline sopravvissute erano comunque in grado di trasmettere CY dopo il completamento dell'incubazione. Le analisi PCR hanno dimostrato che vi erano differenze significative tra la proporzione di cicaline che avevano acquisito CY da piante non trattate rispetto a quelle trattate con alcuni OPS.

Effetti residuali degli insetticidi possono quindi indurre una minore efficienza di acquisizione da parte del vettore, presumibilmente dovuta al disturbo della nutrizione. I risultati della sperimentazione indicano che gli OPS uccidono il vettore troppo lentamente per impedire la trasmissione del fitoplasma. Risultano perciò utili nel ridurre la popolazione del vettore ma non svolgono attività di protezione dall'infezione.

Quando il rischio di trasmissione deriva principalmente da cicaline provenienti dall'esterno della coltura, come nelle colture da fiore, se ne sconsiglia perciò l'uso.

Parole chiave: Fitoplasma CY, *Macrosteles quadripunctulatus*, Organofosforati, Neonicotinoidi, Trasmissione.

Summary

Activity of some insecticides in preventing transmission of *Chrysanthemum yellows* phytoplasma (CY; 16SR-IB)

Control of phytoplasma disease is based on planting healthy plant material and on insecticide treatments against the vectors, since, application of antibiotics against phytoplasmas is not allowed. Some organophosphate insecticides (OPS)(Fenitrothion, chlorpyrifos ethyl, malathion) and a systemic neonicotinoid one, have been tested under controlled conditions to assess their potential in controlling phytoplasma transmission. The tested ops insecticides are used to control the vector of Flavescence dorée to grapevine (Mazzoni *et al.*, 2003; Mazio and Montermini, 2004) while the systemic neonicotinoid one has a well known intense activity in preventing insect transmission of pathogens (Wang *et al.*, 1999; Ahmed *et al.*, 2001). We have used an experimental model system consisting of the *Chrysanthemum yellows* (CY) phytoplasma (16SR-IB), vectored by the leafhopper *Macrosteles quadripunctulatus* to the host plant *Chrysanthemum carinatum*.

Each insecticide was applied to 120 test plants as foliar (OPS) or soil (imidacloprid) application, at the concentrations suggested by the commercial supplier. Water treatment was used as control. At 1, 4, 7, 10, 15 e 20 days after the insecticide application, 20 groups of 5 CY infected leafhoppers

were caged on each plant for an inoculation feeding of 2 days. Inoculated plants were then maintained in the glasshouse for one month until CY symptoms appearance. In a second experiment., the different insecticides were applied to CY-infected plants. Water treatment was used as a negative control. Forty days after the treatments, 100 *M. quadripunctulatus* nymphs were caged on each CY-infected plant for acquisition feeding. The insects that were still alive at the end of the acquisition were transferred to oat for 20 days and then to healthy *C. carinatum*. At the end of the inoculation, CY phytoplasma was detected by PCR in the single insects.

OPS caused a high death rate of the leafhoppers in the first days after their application, and they reduced CY transmission between 20 and 50% at one day and between 0 and 30% at 4 days after their application. The effect on CY transmission after this time was undetectable. On the other hand, in imidacloprid-treated plants, the percentage of CY infection was always about 70% less than in the control experiment. Untreated plants were all infected. The second experiment showed that some leafhoppers were still alive 40 days after the application of OPS. The surviving insects were able to transmit CY, at the end of the latency phase. PCR analyses showed that there were significant differences between the proportion of insect that acquired CY from control and from some OPS-treated plants. Residues of insecticide may be associated with decreased acquisition efficiency, probably due to altered feeding. Our results have shown that OPS kill the vector too slowly to halt phytoplasma transmission. They are therefore useful to reduce the vector population size but they are not effective in protecting from infection. When the risk of transmission is mainly due to hoppers flying into the crop from outside, as in flower crops, their use is not advised.

Key words: CY phytoplasma, *Macrostelus quadripunctulatus*, Organophosphate, Neonicotinoids, Transmission.

Lavori citati

- AHMED N.E., H.O. KANA, Y. SUGIMOTO, Y.Q MA., S. INANANGA, 2001. Effect of imidacloprid on incidence of tomato yellow leaf curl virus. *Plant disease*, **85**, 84-87.
- MAZIO P., A. MONTERMINI, 2004. Verifica dell'efficacia di imidacloprid contro *Scaphoideus titanus* (*Rhyncota cicadellidae*) in vigneti reggiani nel triennio 2000-2002. *Atti giornate fitopatologiche*, **1**, 103-108.
- MAZZONI E., R. COLLA, B. CHIUSA, M. CIAMPITTI, P. CRAVEDI, 2003. Experiences for vector control of grape golden flavescence in Lombardia and Emilia Romagna (Northern Italy) vineyards. (Lozzia C., ed.) *Bulletin OILB/SROP*, **26 (8)**, 221-225.

WANG H., P. DE A. GURISINGHE, B.W. FALK, 1999. Systemic insecticides and plant age affect beet curly to virus transmission to selected host plants. *Plant disease*, **83**, 351-355.

Autore di riferimento: Paolo Saracco Tel. 011 6708529 - e-mail: paolo saracco@unito.it

PROVE DI CONTENIMENTO DEL LEGNO NERO DELLA VITE

N. Mori¹, L. Milanesi², R. Bondavalli³, S. Botti⁴

¹Area Centro Studi, Via Garibaldi, 5, I-37057 San Giovanni Lupatoto (VR)

²Consorzio Fitosanitario Provinciale di Modena,

Via Andreoli, 13, I-41100 Modena

³Consorzio Fitosanitario Provinciale di Reggio Emilia,

Via Gualerzi, 32, I-42100 Reggio Emilia

⁴Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali (DiSTA),

Università di Bologna, Viale Fanin, 44, I-40127 Bologna

In questi ultimi anni nelle regioni nord-est italiane, il Legno nero della vite (“Bois Noir”, BN) è in forte e continua espansione. La lotta insetticida effettuata nei vigneti contro le tignole e gli altri fitofagi della vite non influenza né le densità di popolazione dell’insetto vettore *Hyalesthes obsoletus* Signoret (Cavallini *et al.*, 2003) né l’incidenza e l’incremento della malattia. La modalità di trasmissione a vite dell’agente causale di BN implica il ruolo fondamentale di alcune piante erbacee (es. convulvolo e ortica) che, oltre ad essere piante ospiti dell’insetto vettore, fungono da serbatoio del fitoplasma (Arzone *et al.*, 1995; Maixner *et al.*, 1995; Sforza *et al.*, 1998). Considerando l’inefficacia della tradizionale lotta insetticida nei vigneti e il ruolo di alcune piante erbacee nell’epidemiologia della malattia, l’unica forma di lotta efficace contro *H. obsoletus* sembra essere l’eliminazione selettiva di queste ultime (Weber e Maixner, 1998; Pavan e Stefanelli, 2000).

Durante le stagioni 2002-2004 sono state condotte prove di contenimento del Legno nero attraverso trattamenti erbicidi o insetticidi indirizzati sulle piante ospiti di *H. obsoletus* presenti nel vigneto, sui bordi dello stesso e sulle scoline. Il diserbo è stato effettuato secondo due modalità: impiego di dicotilenocidi in epoca autunno-primaverile oppure di dissesanti nella tarda primavera. Il trattamento insetticida è stato effettuato prima dell’inizio del volo degli adulti di *H. obsoletus* su ortica e convulvolo utilizzando un neonicotinoide dotato di sistemina basipeta. L’efficacia delle strategie proposte è stata valutata sia in pieno campo, confrontando 20 vigneti diversamente trattati, sia in condizioni di semicampo con l’impiego di 363 barbatelle e semenzali di vite in vaso posti ad infettarsi, durante il periodo di volo del vettore, all’interno di parcelle infestate da ortica diversamente diserbate o trattate. Dopo un periodo di circa 2 settimane, i vasi sono stati collocati in una serra a prova di insetto per verificare se manifestavano sintomi attribuibili a BN. L’efficacia delle diverse strategie adottate è stata valutata sia attraverso il campionamento dell’insetto vettore per stimare l’entità delle sue popolazioni sia attraverso la mappatura dei vigneti per individuare le viti che manifestavano per la prima volta sintomi attribuibili a BN.

Sulle piante manifestanti sintomi nei vigneti e su tutte le viti in vaso, sono state condotte analisi molecolari per verificare se erano positive per il fitoplasma agente causale di BN.

I primi dati raccolti hanno evidenziato che la pratica agronomica del diserbo sortisce risultati differenti nel contenimento del LN a seconda del periodo di applicazione e della sostanza attiva impiegata. Buoni risultati sono stati ottenuti con il diserbo autunno - primaverile, ma non con il diserbo totale, che ha addirittura peggiorato la situazione rispetto ai vigneti testimone non diserbati.

L'intervento con un insetticida neonicotinoide ha determinato sia una diminuzione delle popolazioni dell'insetto vettore presenti nel vigneto sia una riduzione significativa del numero di nuove viti sintomatiche rispetto ai vigneti non trattati. In considerazione del fatto che l'applicazione di un insetticida ai bordi dei vigneti e sulle scoline non è proponibile per i fenomeni di deriva e lisciviazione della sostanza attiva, sono in corso ulteriori indagini per verificare se l'impiego di questo insetticida, caratterizzato da un meccanismo d'azione diverso da quelli tradizionalmente utilizzati in vigneto, risulta efficace nel controllo di LN anche quando impiegato nel solo vigneto.

Le analisi effettuate sulle viti hanno evidenziato la presenza solo di BN: mentre in campo la percentuale di viti sintomatiche e quelle risultate positive all'analisi sono risultate simili, sui semenzali e le barbatelle, anche dopo 12-15 mesi dall'inoculo, hanno rivelato l'impossibilità di correlare la presenza del sintomo a quella del fitoplasma in quanto una elevata percentuale di piante sintomatiche è risultata negativa al saggio molecolare seppur portata a livelli di sensibilità molto elevata ("bi-nested" PCR).

Parole chiave: Legno nero, *Hyalesthes obsoletus*, Lotta integrata.

Summary

Experimental trials to control "Bois noir" disease on grapevine

In the last years, in North -Eastern Italy regions, grapevine Bois Noir (BN) disease is increasing in spreading importance. The insecticides applications against grape berry moth and other pests do not influence neither the population density of the vector *Hyalesthes obsoletus* Signoret (Cavallini *et al.*, 2003), nor increase incidence of the disease. The natural transmission of BN to grapevine encompasses a fundamental role of some weeds (i.e. bindweed and nettle) that can also harbour BN phytoplasmas and that are supposed to be host for the insect vector (Arzone *et al.*, 1995; Maixner *et al.*, 1995; Sforza *et al.*, 1998). Considering the poor effectiveness of chemical spray and the important epidemiological role of some weeds, the only possible control of *H. obsoletus* appears to be the selective elimination

of weeds hosting the phytoplasma (Weber and Maixner, 1998; Pavan and Stefanelli, 2000).

During 2002-2004 seasons, experimental trials to control BN, were carried out using herbicides or insecticides on weeds hosting *H. obsoletus* in vineyards. The effectiveness of some adopted strategies has been evaluated both by means of the sampling of the insect vector to verify the amount of its populations, and by mapping the vineyards in order to detect plants exhibiting for the first time BN symptoms. Field trials were performed in 20 vineyards as well as under semi-fields conditions by using 363 grafted cuttings and seedling grapevines in pots. These plants were located, during the vector flying period, in plots in which nettle (*Urtica dioica*) present was weeded or chemically treated in different ways. After about 2 weeks the pots were transferred under insect-proof greenhouse to verify the appearance of BN-related symptoms. Molecular analysis was performed on symptomatic plants in vineyards and on all the potted plants to verify phytoplasma presence and identity. The preliminary data indicate that weeding can produce different results depending on the application period and the active substance used for it. Satisfying results were obtained by weeding during Autumn-Spring all the large leaf plants, while by weeding in late Spring all the plants present inside the vineyard as well as in the borders, the number of new grapevine plants exhibiting symptoms was higher than the one observed in non weeded vineyards. The use of a neonicotinoid insecticides on nettle and bindweed plants before the beginning of adult *H. obsoletus* fly, gives a reduction on insect vector populations inside the vineyard and a significant reduction of new symptomatic grapevine plants in comparison with those observed in untreated vineyards. Considering that the use of insecticides at the border of vineyard as well as in drains, can be very dangerous because of drift and of the run off of the active substances and taking into account that new insecticides with basipetal systemic diffusion in the plant are available, new tests are in progress to verify their effectiveness to control BN spreading by treating only the upper part (leaves) of the weeds.

The molecular analysis have permitted to detect BN only: while in the field the percentage of symptomatic grapevines and those resulted positive to the molecular test was about the same, on seedlings and grafted cuttings 12-15 months after the inoculation, the analysis revealed the lack of correspondence between symptoms and phytoplasma detection; a very high percentage of symptomatic plants resulted negative to the bi-nested PCR analyses.

Key words: Bois Noir, *Hyalesthes obsoletus*, Integrated pest control.

Lavori citati

- ARZONE A., A. ALMA, D. BOSCO, A. PATETTA, 1995. MLO-infected weeds in the vineyards of North-western Italy. *Journal of Phytopathology*, **143**, 257-260.
- CAVALLINI G., A. CASTIGLIONI, P. BORTOLOTTI, N. MORI, R. NICOLI ALDINI, S. BOTTI, A. MALOSI, A. BERTACCINI, 2003. Flavescenza dorata e Legno nero nel Modenese. *L'informatore agrario*, **2**, 69-71.
- MAIXNER M., U. AHRENS, E. SEEMÜLLER, 1995. Detection of the German grapevine yellows (Vergilbungskrankheit) MLO in grapevine, alternative host and a vector by a specific PCR procedure. *European Journal of Plant Pathology*, **101 (3)**, 241-250.
- PAVAN F., G. STEFANELLI, 2000. Strategie di lotta contro *Scaphoideus titanus* Ball e *Hyalesthes obsoletus* Signoret vettori di fitoplasmi associati ai giallumi della vite. Atti convegno "Flavescenza dorata e Legno nero della vite in Friuli Venezia Giulia: i risultati di un programma pluriennale di controllo". Gorizia 5 novembre 1999, 71-78
- 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 (11-12)**, 549-556.
- WEBER A., M. MAIXNER, 1998. Habitat requirements of *Hyalesthes obsoletus* Signoret (Auchenorrhyncha: Cixiidae) and approaches to control this planthopper in vineyards. Integrated control in viticulture. Proceedings of the Meeting at Godollo, Hungary, 4-6 March 1997. *Bulletin OILB/SROP*, **21 (2)**, 77-78.

Parte del lavoro è stato effettuato con finanziamenti della Regione Emilia Romagna (L.R. 28/98) nell'ambito di progetti coordinati dal CRPV.

**FUNGHI ENDOFITI DELLA VITE CON POSSIBILE
IMPLICAZIONE NEL RECOVERY DA
FLAVESCENZA DORATA**

R. Musetti, M. Martini, S. Borselli, R. Osler

Dipartimento di Biologia Applicata alla Difesa delle Piante,
Università di Udine, Via delle Scienze, 208, I-33100 Udine

Le basi fisiologiche del recovery, remissione spontanea dei sintomi già segnalata in piante di melo, albicocco e vite infettate con fitoplasmi (Osler *et al.*, 1999; Carraro *et al.*, 2004), risultano ancora non del tutto note. Recentemente è stata ipotizzata l'applicazione di H₂O₂ e di alcuni metaboliti ed enzimi legati alla produzione di ROS (Reactive oxygen species) (Musetti *et al.*, 2004; 2005). Queste osservazioni, insieme con il fatto che piante "recovered" hanno dimostrato in natura una minor probabilità di re-infettarsi rispetto a quelle da sempre sane (Osler *et al.*, 1999), fanno presupporre che nel recovery intervenga una sorta di resistenza sistemica acquisita (SAR). È altresì noto che le piante in natura sono colonizzate da microrganismi endofiti (funghi, batteri, attinomiceti, che non provocano sintomi visibili) che inducono le piante a produrre metaboliti che le proteggono contro patogeni e insetti dannosi. Basandoci su queste considerazioni, abbiamo iniziato una ricerca per isolare ed identificare popolazioni endofitiche fungine in piante di vite che, all'interno di uno stesso vigneto, presentavano le seguenti caratteristiche, rispettivamente: sempre sane asintomatiche; piante infette sintomatiche da almeno 4 anni; "recovered". Le analisi sono state condotte su 15 viti, cv. Prosecco, 5 per ogni tipo. Gli endofiti fungini sono stati isolati incubando piccoli frammenti di foglie o di tralci (previa disinfezione con ipoclorito di sodio 3%) in PDA per 48 h (25 °C, 60% U.R.); i funghi sono stati successivamente trasferiti in nuove piastre di PDA fino ad ottenere colture pure, quindi, in tubi mantenuti a 4 °C al buio. In tutto sono stati isolati 94 endofiti fungini: 13 presenti esclusivamente nelle viti infette (D); 6 nelle sane (H) e 5 nelle "recovered" (R); 3 isolati sono risultati presenti sia nelle viti sane che in quelle "recovered" (HR). I rimanenti 67 risultavano essere presenti in piante sane, infette e "recovered" (HDR). Solo gli endofiti H, R, e RH sono stati identificati; essi appartengono ai generi *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Arthrinium*, *Fusarium*, *Epicoccum*, *Schizophyllum*, *Stemphylium*, *Trichoderma*. Passo immediatamente successivo di questa ricerca sarà quello di verificare l'efficacia di questi endofiti sia a difesa di viti con FD che come induttori di recovery.

Parole chiave: Endofiti, Flavescenza dorata, Recovery.

Summary

Grapevine endophytes with possible involvement in the recovery from Flavescence dorée infection

The physiological reasons of recovery, the spontaneous remission of symptoms in diseased plants reported in apple, apricot and grapevine affected by phytoplasmas (Osler *et al.*, 1999; Carraro *et al.*, 2004), are still not completely known. Recently, the involvement of H₂O₂ and some ROS-related metabolites and enzymes in the recovery phenomenon has been hypothesized (Musetti *et al.*, 2004; 2005). These observations, together with the fact that recovered plants can be re-infected in nature in a lesser extent than the never infected ones (Osler *et al.*, 1999), indicate that a type of systemic acquired resistance (SAR) could be involved in inducing recovery.

Endophytes (fungi, bacteria and actinomycetes that spend part or all of their life cycle within plant tissues, without causing visible symptoms of diseases) can colonize host tissues before the pathogens. They contribute to enhance fitness of the plant by producing secondary metabolites, such as phytohormones, toxic metabolites, biological insecticides and various mycotoxins (Strobel, 2002), that protect plants against insects, pests and pathogens (Wilson, 2000). For these reasons, a screening to isolate, identify and compare fungal endophytes in never infected (asymptomatic), FD-infected, symptomatic since four years, and recovered grapevine plants was performed. Analyses were applied to fifteen grapevine plants, cv. Prosecco, 5 for each thesis. Fungal endophytes were isolated incubating leaf and shoot fragments (previously sterilized by immersion in 3% sodium hypochlorite) in PDA medium for 48h (25 °C, 60% R.U.); they were sub-cultured in PDA until obtaining pure cultures, then transferred onto slants and kept at 4 °C in the dark. In total 94 different fungal endophytes were isolated, 13 from the diseased plants (D), 6 from the healthy (H), 5 from the recovered ones (R); 3 fungi resulted to colonize both healthy and recovered grapevines (HR). The remaining 67 endophytes were isolated from healthy, FD-infected and recovered plants (HDR). Only H, R and HR endophytes were identified. They resulted to belong to the genera *Alternaria*, *Aureobasidion*, *Arthrinium*, *Fusarium*, *Epicoccum*, *Schizophyllum*, *Stemphylium*, *Trichoderma*. The efficacy of these endophytes in protecting grapevine plants against FD or in inducing recovery will be studied and here discussed.

Key words: Endophytes, Flavescence dorée, Recovery.

Lavori citati

- CARRARO L., P. ERMACORA, N. LOI, R. OSLER, 2004. The recovery phenomenon in Apple proliferation-infected apple trees. *Journal of Plant Pathology*, **86**, 141-146.
- MUSETTI R., L. SANITÀ DI TOPPI, P. ERMACORA, M.A. FAVALI, 2004. Recovery in apple trees infected with the apple proliferation phytoplasma: an ultrastructural and biochemical study. *Phytopathology*, **94**, 203-208.
- MUSETTI R., L. SANITÀ DI TOPPI, M. MARTINI, F. FERRINI, A. LOSCHI, M.A. FAVALI, R. OSLER, 2005. Hydrogen Peroxide Localization and Antioxidant Status in the Recovery of Apricot Plants from European Stone Fruit Yellows. *European Journal of Plant Pathology*, **112**, 53-61.
- OSLER R., N. LOI, L. CARRARO, P. ERMACORA, E. REFATTI, 1999. Recovery in plants affected by phytoplasmas. *Proceedings of the 5th Congress of the European Foundation for Plant Pathology*, 589-592.
- STROBEL G.A., 2002. Rainforest endophytes and bioactive products. *Critical Reviews in Biotechnology*, **22**, 315-333.
- WILSON D. 2000. Ecology of woody plant endophytes. In: *Microbial Endophytes* (Bacon C. W., White J.F. jr., eds), Marcel Dekker, inc., New York 389-420.

Lavoro svolto nell'ambito del PF "I giallumi della vite: un fattore limitante per le produzioni vitivinicole", finanziato dal Ministero per le Politiche Agricole e Forestali.
Autore di riferimento: Musetti Rita - e-mail: Rita.Musetti@uniud.it

**INDIVIDUAZIONE E LOCALIZZAZIONE DI UN SIMBIONTE
'CANDIDATUS CARDINIUM SP.' IN ORGANI E TESSUTI DI
SCAPHOIDEUS TITANUS, INSETTO VETTORE DELLA
FLAVESCENZA DORATA IN VITIS VINIFERA**

**M. Pajoro^{1,2}, M. Marzorati¹, A. Alma², L. Sacchi³,
S. Palermo², R. Tedeschi², L. Brusetti¹, N. Raddadi¹,
F. Quaglino⁴, P.A. Bianco⁴, C. Bandi⁵, D. Daffonchio¹**

¹Dipartimento di Scienze e Tecnologie Alimentari e Microbiologiche (DISTAM),
Via Celoria 2, I-20133 Milano

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 Biologia Animale (DBA), Università di Pavia,
Piazza Botta, 9, I-27100 Pavia

⁴Istituto di Patologia Vegetale, Università di Milano,
Via Celoria, 2, I-20133 Milano

⁵DIPAV, Sezione di Patologia Generale e Parassitologia,
Università di Milano, Via Celoria, 10, I-20133 Milano

La Flavescenza Dorata (FD) è una grave fitoplasmosi della vite, causa di ingenti danni di ordine produttivo, economico ed ecologico in molti comprensori viti-vinicoli europei. L'agente eziologico è il '*Candidatus Phytoplasma vitis*.' 16SrV (sottogruppi C e D) appartenente alla classe dei *Mollicutes* (Martini *et al.*, 1999; Angelini *et al.*, 2001). Tale batterio viene naturalmente diffuso nei vigneti da *Scaphoideus titanus*, un omottero cicadellide di origine nearctica (Bianco *et al.*, 2001). Nel corso di una ricerca volta allo studio, in areali viticoli piemontesi, della popolazione microbica associata a *S. titanus* sono state caratterizzate mediante Length Heterogeneity PCR (LH-PCR) le comunità batteriche associate ad un'ampia collezione di *S. titanus* raccolti in vigneti fortemente contaminati da FD. Si sono utilizzati primers universali per batteri e successiva separazione dei frammenti per elettroforesi capillare (Suzuki *et al.*, 1998; Ritchie *et al.*, 2000). È stato individuato un particolare microrganismo conservato nella popolazione microbica degli individui di *S. titanus* esaminati. Dopo un'analisi DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) (Muyzer *et al.*, 1993), sequenziamento del gene per il 16S rRNA e successivo confronto in banca dati, è stato possibile attribuire tale microrganismo all'ordine dei *Bacteroidetes* con il 98% di omologia con '*Candidatus Cardinium hertigii*' un'endosimbiote obbligato di insetti, trasmesso verticalmente (trasmissione transovarica), finora mai associato a cicadellidi. Successive analisi di microscopia elettronica a trasmissione (TEM) e di PCR con primers specifici, hanno permesso di localizzare negli ovociti, nei corpi grassi, nell'intestino e nelle ghiandole salivari

degli individui di *S. titanus* il 'Candidatus Cardinium sp.'. Inoltre, mediante TEM e PCR specifica, si è individuata a livello dell'intestino, delle ghiandole salivari e dei corpi grassi la presenza di 'Candidatus Phytoplasma vitis'. I dati di studio della prevalenza di 'Candidatus Cardinium sp.' e 'Candidatus Phytoplasma vitis' nelle popolazioni di *S. titanus* analizzate hanno mostrato la presenza dei due batteri rispettivamente nel 100% e 14% degli individui esaminati. L'insieme di tali evidenze indicano una co-localizzazione di 'Candidatus Cardinium' sp. e 'Candidatus Phytoplasma vitis' in diversi organi e tessuti di *S. titanus*, e considerando la prevalenza di 'Candidatus Cardinium sp.' nell'insetto, si ipotizza la sua valenza quale potenziale batterio antagonista di 'Candidatus Phytoplasma vitis' per il biocontrollo della FD.

Parole chiave: Endosimbionte, LH-PCR, Fitoplasma, Transmission Electron Microscopy, *Scaphoideus titanus*.

Summary

Individuation and localization of 'Candidatus Cardinium sp.' **endosymbiont in tissues and organs of *Scaphoideus titanus*,** **insect vector of Flavescence dorée in *Vitis vinifera***

The Flavescence Dorée (FD) is a grapevine disease that causes many economical and ecological problems in several wine production areas in Europe. FD is caused by cell wall-less bacteria, 'Candidatus Phytoplasma vitis' 16SrV (subgroups C e D), belonging to the *Mollicutes* class (Martini *et al.*, 1999; Angelini *et al.*, 2001). This microorganism is naturally spread through the plants in the vineyard by a leafhopper the *Homoptera Cicadellidae*, *Scaphoideus titanus* (Bianco *et al.*, 2001). During a survey to characterize the microflora associated to *S. titanus* recovered from FD contaminated vineyards in Piedmont, we identified by Length Heterogeneity PCR (LH PCR) using universal primers for bacteria a major peak conserved in all the individuals (males and females) examined. Characterization by DGGE analysis (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) (Muyzer *et al.*, 1993) and complete sequencing of the 16S rRNA gene showed that this microorganism has a 98% of identity with 'Candidatus Cardinium hertigii', an insect obliged endosymbiont transovarically transmitted, previously never associated to any sharpshooter leafhopper.

Bacterial cells with the typical morphology of the endosymbiont *Bacteroidetes* 'Candidatus Cardinium hertigii' were detected by transmission electron microscopy (TEM) and by specific PCR in oocytes of females and in the fat bodies, guts and salivary gland cells of both genders of *S. titanus*, fed for three months on phytoplasma-contaminated grapevine plants. Moreover, 'Candidatus Phytoplasma vitis' were detected in the gut, fat bodies and in

the cytoplasm of salivary gland cells by TEM and specific PCR. Prevalence studies of '*Candidatus Cardinium* sp.' and '*Candidatus Phytoplasma vitis*' in *S.titanus* populations showed the presence of the two microorganisms in the 100% and 14% of the insects examined, respectively.

All these data showed a co-localization of the two microorganisms in several organs of *S.titanus* and considering the prevalence percentages in the insects, it can be hypothesized the role of '*Candidatus Cardinium* sp.' as an antagonist of '*Candidatus Phytoplasma vitis*' for the FD biocontrol.

Key words: Endosymbiont, LH-PCR, Phytoplasma, Transmission Electron Microscopy, *Scaphoideus titanus*.

Lavori citati

- ANGELINI E., D. CLAIR, M. BORGIO, A. BERTACCINI, E. BOUDON-PADIEU, 2001. Flavescence Dorée in France and Italy: occurrence of closely related phytoplasma isolates and their near relationships to palatinate grapevine yellows and an alder yellows phytoplasma. *Vitis*, **40**, 79-86.
- BIANCO P.A., A. ALMA, P. CASATI, G. SCATTINI, A. ARZONE, 2001. Transmission of 16Srv phytoplasmas by *Scaphoideus titanus* Ball in Northern Italy. *Plant Protection Science*, **37**, 49-56.
- MARTINI M., E. MURARI, N. MORI, A. BERTACCINI, 1999. Identification and epidemic distribution of two flavescence dorée-related phytoplasmas in Veneto (Italy). *Plant Disease*, **83**, 925-930.
- MUYZER G., E.C. DE WAAL, A.G. UITERLINDEN, 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Ecol.*, **59**, 695-700.
- RITCHIE N.J., M.E. SCHUTTER, R.P. DICK, D.D. MYROLD, (2000) Use of length heterogeneity PCR and fatty acid methyl ester profiles to characterize microbial communities in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**, 1668-1675.
- SUZUKI M., M.S. RAPPE, S.J. GIOVANNONI, 1998. Kinetic bias in estimates of coastal picoplankton community structure obtained by measurements of small-subunit rRNA gene PCR amplicon length heterogeneity. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**, 4522-4529.

Autore di riferimento: Daniele Daffonchio - e-mail: daniele.daffonchio@unimi.it

POSTER

I giallumi della vite: un fattore limitante le produzioni vitivinicole. Rilevamento di auchenorrhinchi vettori accertati e potenziali di fitoplasmi	
A. Alma, F. Lessio, F. Pavan, V. Forte, E. Angelini, M. Borgo, B. Bagnoli, F. Pinzauti, V. Trivellone	151
Identificazione stagionale e caratterizzazione dei fitoplasmi associati ai giallumi della vite	
E. Angelini, L. Filippin, C. Michellini, M. Borgo	155
Dinamica di colonizzazione stagionale del fitoplasma apple proliferation in relazione ad alcuni parametri fisiologici nelle piante	
P.L. Bianchedi, A.M. Ciccotti, F. Pedrazzoli, R. Zorer	157
Monitoraggio dei giallumi della vite e caratterizzazione dei fitoplasmi nell'ambito del progetto finalizzato "GIA.VI" nel 2004	
M. Borgo, E. Angelini, L. Filippin, S. Botti, C. Marzachì, P. Casati, F. Quaglino, A. Zorloni, G. Albanese, R. La Rosa, G. Pasquini, A. Bertaccini	161
Identificazione di fitoplasmi riscontrati in viti affette da giallumi nell'ambito dei controlli effettuati in Regione Lombardia dal Servizio Fitosanitario nell'anno 2004	
M. Calvi, B. Cavagna, M. Celè	165
Trasmissione di apple proliferation tramite anastomosi radicali	
A. M. Ciccotti, P.L. Bianchedi, P. Bragagna, M. Deromedi, M. Filippi, F. Forno, L. Mattedi	169
Monitoraggio dei giallumi della vite in Abruzzo	
D. D'Ascenzo, S. Murolo, R. Di Giovanni, B. M. Branzanti, G. Romanazzi	173
Indagine epidemiologica in un vigneto affetto da "legno nero" nel nord-Sardegna	
R. Garau, V.A. Prota, A. Sechi, A. Lentini, S. Botti, G. Tolu, A. Bertaccini	177
Indagini sulla presenza della flavescenza dorata della vite e di <i>Scaphoideus titanus</i> in Basilicata	
C. Marccone, I. Camele, V. Castoro, R. Spicciarelli	181
Monitoraggio dei vettori dei fitoplasmi della vite in Lombardia ed Emilia Romagna (Italia settentrionale)	
E. Mazzoni, P. Cravedi, R. Nicoli Aldini, F. Pavesi	185
Diffusione del legno nero nelle principali aree viticole del Lazio	
G. Pasquini, L. Ferretti, V. Lumia, R. Sciarroni	189

Gravi deperimenti associati al giallume europeo delle drupacee (european stone fruit yellow ESFY) in un impianto biologico nel Lazio	
G. Pasquini, V. Lumia, L. Ferretti	193
Possibile trasmissione di fitoplasmi 16SrX-B mediante <i>Empoasca decedens</i> P. ed <i>Empoasca</i> spp. a <i>Prunus domestica</i> L. ed a <i>Prunus salicina</i> Lindl	
M. Pastore, S. Paltrinieri, M. Petriccione, R. Priore, A. Bertaccini	197
Strategie di controllo della flavescenza dorata della vite	
F. Pavan, C. Bellomo, L. Carraro, P. Ermacora, M. Martini, A. Loschi, R. Osler, P.A. Bianco, G. Belli, A. Zorloni, P. Casati, F. Quaglino, M. Borgo, E. Angelini	199
Indagini sulla presenza del giallume europeo delle drupacee (ESFY) e di altri fitoplasmi in piante spontanee in provincia di Trento	
C. Poggi Pollini, L. Giunchedi, M. Gobber, P. Miorelli, D. Pignatta, F. Terlizzi	201
Microflora batterica endofita in viti affette da flavescenza dorata (FD) e soggette a "recovery"	
F. Quaglino, P. Casati, M. Marzorati, L. Brusetti, R. Tedeschi, D. Daffonchio, A. Alma, P.A. Bianco	205
Variabilità genetica di fitoplasmi appartenenti alla specie "<i>Candidatus Phytoplasma ulmi</i>" riscontrati in un olmo (<i>Ulmus minor</i>) secolare	
F. Quaglino, P. Casati, T. Eccher, P.A. Bianco	209
Presenza di differenti isolati di "<i>Candidatus Phytoplasma solani</i>" associati al legno nero (LN) della vite in Lombardia, Toscana e Marche	
F. Quaglino, A. Zorloni, P. Casati, P.A. Bianco, G. Belli	213
Prove di multiplex Real-Time PCR per la diagnosi dei fitoplasmi del legno nero e della flavescenza dorata della vite	
F. Terlizzi, A.R. Babini, C. Ratti, R. Credi	217
Diagnostics of ESFY in symptomless apricot trees - disagreement between molecular and biological assays	
J. Salava, J. Polák, M. Bryxiová, J.Svoboda	221

**I GIALLUMI DELLA VITE: UN FATTORE LIMITANTE
LE PRODUZIONI VITIVINICOLE.
RILEVAMENTO DI AUCHENORRINCHI VETTORI
ACCERTATI E POTENZIALI DI FITOPLASMI**

**A. Alma¹, F. Lessio¹, F. Pavan², V. Forte³, E. Angelini³,
M. Borgo³, B. Bagnoli⁴, F. Pinzauti⁴, V. Trivellone⁴**

¹Di.Va.P.R.A. Entomologia e Zoologia applicate all'Ambiente "Carlo Vidano",
Università di Torino, Via L. da Vinci 44,
I-10095 Grugliasco (TO)

²Dipartimento di Biologia Applicata alla Difesa delle Piante,
Università di Udine, Via delle Scienze, 208, I-33100 Udine

³C.R.A. - Istituto Sperimentale per la Viticoltura,
Viale XXVIII Aprile, 26, I-31015 Conegliano (TV)

⁴C.R.A. - Istituto Sperimentale per la Zoologia Agraria,
Via Lanciola, 12/a, I-50125 Cascine del Riccio (FI)

Le ampelopatie causate da fitoplasmi, note come giallumi, rappresentano un importante fattore limitante per lo sviluppo della viticoltura. In Italia, la malattia che desta maggiori preoccupazioni è la Flavescenza dorata (FD), causata da fitoplasmi del gruppo 16SrV (sottogruppi c, d) trasmessi dall'ampelofago obbligato *Scaphoideus titanus* Ball; a decorso meno epidemico risulta invece il Legno nero (LN), dovuto a fitoplasmi del gruppo 16SrXII e trasmesso dall'ampelofago occasionale *Hyalesthes obsoletus* Signoret (Boudon-Padieu, 2003). Nell'ambito del progetto GIAVI, nel corso del 2004 è stata condotta un'indagine per rilevare presenza e diffusione degli insetti vettori noti e potenziali di fitoplasmi sul territorio nazionale.

Il monitoraggio è stato effettuato da aprile ad ottobre in diverse aree viticole di Piemonte, Valle d'Aosta, Veneto, Friuli-Venezia Giulia, Toscana e Lazio. Sono stati eseguiti dapprima conteggi degli stadi giovanili di *S. titanus* sulle foglie della vite, e successivamente la presenza degli adulti (sia *S. titanus* che *H. obsoletus*) è stata rilevata posizionando trappole collanti gialle all'interno dei vigneti, ed eseguendo campionamenti con retino entomologico. Parallelamente, l'indagine faunistica è stata condotta anche nei confronti di altri auchenorrinchi dell'agroecosistema vigneto. In laboratorio le specie raccolte in campo sono state preparate e classificate. Preliminari allevamenti per osservazioni bio-etologiche e diagnosi molecolare di campioni di specie di cicaline vettrici note e potenziali sono stati condotti.

S. titanus è risultato presente in tutte le regioni ad eccezione del Lazio, pur con diverse densità di popolazione. Relativamente diffuso è stato anche *H. obsoletus*, che tuttavia è stato più abbondante su piante erbacee spontanee quali ortica e convulvolo che non sulla vite stessa. Sono state inoltre ritrovate numerose specie di auchenorrinchi infeudati alle piante spontanee dimoranti nell'agroecosistema vigneto,

delle quali alcune sono note come vettori di fitoplasmi (Nielson, 1979). Tra le più interessanti meritano di essere ricordate i cixiidi *H. luteipes* Fieber, *Reptalus panzeri* (Löw), *R. quinquecostatus* (Dufour) e *Cixius* sp., ed i cicadellidi deltocefalini *Euscelidius variegatus* (Kirschbaum), *Euscelis incisus* (Kirschbaum), *Fiebertiella florii* (Stål), *Anoplotettix fuscovenosus* (Ferrari), *A. putoni* Ribaut e *Macrosteles quadripunctulatus* (Kirschbaum).

Parole chiave: Agroecosistema vigneto, Flavescenza dorata, Legno nero, Cicaline, Diffusione.

Summary

Grapevine yellows: a limiting factor for wine growing, sampling of auchenorrhyncha known and suspected to be phytoplasma vectors

Grapevine diseases caused by phytoplasmas, known as grapevine yellows, are an important limiting factor of vine growing. In Italy, the most threatening disease is Flavescence dorée (FD), caused by phytoplasmas belonging to the 16SrV group (subgroups c, d), and transmitted by *Scaphoideus titanus* Ball, which is monophagous on grapevine; on the other hand, Bois noir (BN), caused by phytoplasmas belonging to the 16SrXII group and transmitted by *Hyalesthes obsoletus* Signoret, which only occasionally feeds on grapevine, seldom causes severe outbreaks (Boudon-Padieu, 2003). A research on the occurrence and distribution of the insects known or suspected to be vectors of phytoplasmas in Italy was conducted during 2004, within the activities of the GIAVI project.

Sampling was made from April to October in many vine growing areas of Piedmont, Aosta Valley, Friuli-VG, Tuscany and Latium. Nymphs of *S. titanus* were counted on vine leaves, and in a second time adults (both of *S. titanus* and *H. obsoletus*) were captured by placing yellow sticky traps inside vineyards, and by sweep-net samplings. At the same time, the study of the fauna also regarded the other species living in the vineyard ecosystem. The specimens collected in the field were prepared and determined in the laboratory. Preliminary rearings of leafhoppers and planthoppers known or suspected vectors of phytoplasmas and molecular diagnoses were also carried out.

S. titanus was found in all regions except Latium, presenting however different population densities. *H. obsoletus* was also relatively widespread, although it was found rather on herbaceous weeds such as nettle and bindweed than on grapevine. Many other species of Auchenorrhyncha, some of which are known to be phytoplasma vectors (Nielson, 1979), were also found on spontaneous plants living within the vineyard ecosystem. Among

the most interesting ones, the following are meaningful to be mentioned: the cixiids *H. luteipes* Fieber, *Reptalus panzeri* (Löw), *R. quinquecostatus* (Dufour) and *Cixius* sp., and the deltocephaline cicadellids *Euscelidius variegatus* (Kirschbaum), *Euscelis incisus* (Kirschbaum), *Fieberiella florii* (Stål), *Anoplotettix fuscovenosus* (Ferrari), *A. putoni* Ribaut and *Macrosteles quadripunctulatus* (Kirschbaum).

Key words: Vineyard ecosystem, Flavescence dorée, Bois noir, Leafhoppers, Distribution.

Lavori citati

- BOUDON-PADIEU E., 2003. The situation of grapevine yellows and current research directions: distribution, diversity, vectors, diffusion and control. *In*: Proceedings, 14th ICVG Conference, 12-17 September 2003, Locorotondo (BA), Italy, 47-53.
- NIELSON M.W., 1979. Taxonomic relationships of leafhoppers vectors of plant pathogens. *In*: Leafhopper vectors and plant disease agents. (K. Maramorosch and K. F. Harris, ed.), Acad. Press. New York, San Francisco, London, 3-27.

Lavoro svolto nell'ambito del PF "I giallumi della vite: un fattore limitante per le produzioni vitivinicole", finanziato dal Ministero per le Politiche Agricole e Forestali.

IDENTIFICAZIONE STAGIONALE E CARATTERIZZAZIONE DEI FITOPLASMI ASSOCIATI AI GIALLUMI DELLA VITE

E. Angelini, L. Filippin, C. Michielini, M. Borgo

C.R.A. - Istituto Sperimentale per la Viticoltura,
Viale XXVIII Aprile, 26, I-31015 Conegliano (TV)

L'attività di monitoraggio per seguire l'espandersi dei giallumi da fitoplasmi della vite nel territorio italiano prosegue da almeno un decennio. Il presente studio ha previsto sia l'indagine sintomatologica in vigneto sia l'analisi biomolecolare (PCR/RFLP) del DNA su campioni di foglie di piante malate raccolte da vari prelevatori. In questo modo si è potuta analizzare la distribuzione dei vari agenti patogeni in relazione agli ambienti e all'andamento temporale della comparsa della malattia.

Le piante sintomatiche sono risultate affette da 3 tipi di giallumi: Legno nero (Bois Noir = BN, sottogruppo ribosomico 16SrXII-A) e Flavescenza dorata di tipo C e D (FD-C e FD-D) causata da fitoplasmi appartenenti rispettivamente ai sottogruppi ribosomici 16SrV-C e 16SrV-D. Sono stati presi in considerazione i risultati ottenuti nel periodo 1999-2004, suddivisi in base al mese in cui è stato raccolto il campione. La maggior parte dei campioni proveniva da vigneti monitorati in Veneto e in particolare dalla provincia di Treviso (563 campioni su 751 totali), dove è presente FD appartenente sia al sottogruppo C che D.

I risultati hanno dato le seguenti informazioni:

- le viti con sintomi più precoci, visibili già da inizio giugno (circa il 3% dei campioni totali, 21 su 751), sono risultate affette da FD-C per l'80%, mentre FD-D e BN si dividono equamente i rimanenti campioni positivi;
- con l'avanzare della stagione, si è osservata una diminuzione percentuale della incidenza di FD-C a favore di un netto aumento di BN, mentre la presenza percentuale FD-D si è mantenuta su valori più stabili;
- si evince una elevata relazione tra sintomi e presenza di fitoplasmi durante tutto il periodo di osservazione: in media il 92,7% dei campioni sintomatici sono risultati positivi al test PCR;
- è possibile identificare con successo e caratterizzare i fitoplasmi presenti su quasi tutti i campioni di vite che presentano sintomi di giallumi, indipendentemente dall'epoca di campionamento e dal sistema di estrazione.

Parole chiave: Giallumi, Fitoplasmi, Sintomi.

Summary

During the season identification and characterization of phytoplasmas associated to grapevine yellows

Survey work aimed to check the spreading of phytoplasmas associated to grapevine yellows (GY) in Italy have been going on for a decade at least. The present study included both the vineyard symptomathologic investigation and the biomolecular analyses (PCR/RFLP) of the DNA, extracted from leaves samples collected from symptomatic vines. The occurrence of the different GY pathogenous agents was observed in relation to the environment and the chronological trend of the disease appearance.

Three types of GY were detected: Bois noir (BN, ribosomal subgroup 16SrXII-A), Flavescence dorée type C and D (FD-C and FD-D), caused by phytoplasmas belonging respectively to ribosomal subgroups 16SrV-C and 16SrV-D. The samples came mostly from vineyards located in Veneto region and particularly in Treviso province (563 samples out of 751), where FD of both types, C and D, occurs.

The data of the 1999-2004 period were considered on the basis of monthly sample collection and gave the following results:

- grapevines with the earliest symptoms, visible at the beginning of June (about 3% of total samples, 21 out of 751), were infected with FD-C to an extent of 80%, while the remaining positive samples are equally shared between FD-D and BN;
- advancing the season, a steady percentage decrease of the FD-C incidence was observed, in favour of a clear increase of BN, whereas FD-D percentage presence remained stable;
- a high relation between the symptoms and the occurrence of phytoplasma during the entire observation period was noted: on the average 92.7% of the symptomatic samples were positive to the PCR assay;
- phytoplasma identification and characterization is successful in almost all the symptomatic grapevine samples, independently on the period of sampling and the method employed for the DNA extraction.

Key words: Grapevine yellows, Phytoplasma, Symptoms.

Autore di riferimento: Elisa Angelini - e-mail: elisa.angelini@ispervit.it

**DINAMICA DI COLONIZZAZIONE STAGIONALE DEL
FITOPLASMA APPLE PROLIFERATION IN RELAZIONE
AD ALCUNI PARAMETRI FISIologici NELLE PIANTE**

**P.L. Bianchedi, A.M. Ciccotti,
F. Pedrazzoli, R. Zorer**

Istituto Agrario San Michele all'Adige,
Via Mach 1, I-38010 San Michele all'Adige (TN)

Una grave malattia che colpisce le piante di melo in diverse aree frutticole europee è rappresentata da Apple Proliferation (AP). Le piante infette presentano una tipica sintomatologia: scopazzi, arrossamenti fogliari precoci in autunno, stipole ingrandite e fioriture tardive (Giunchedi, 2003) e nel complesso una minor resa quali-quantitativa. Gli effetti di AP sulla fisiologia e sulla crescita delle piante di melo sono stati a tutt'oggi poco studiati. Sembra tuttavia che il fitoplasma possa essere causa di alterazioni dell'attività fotosintetica e del metabolismo fogliare (Bertamini *et al.*, 2002).

Nel presente lavoro è stata seguita per due stagioni consecutive (2003-2004), con metodo DAPI, la dinamica di colonizzazione e la distribuzione del fitoplasma AP in piante di "Golden Delicious" coltivate in ambiente di fondovalle del Trentino-Alto Adige. Contemporaneamente, sulle stesse piante infette più un controllo sano, sono stati rilevati, a differenti livelli, alcuni parametri fisiologici quali SPAD, efficienza quantica (FV/FM) e specific leaf area (SLA), correlati in varia misura con l'attività fotosintetica e il contenuto in clorofilla. Ciò al fine di valutarne le possibili interazioni con questa patologia. La presenza del fitoplasma AP nella pianta segue un andamento tipicamente stagionale: in primavera esso è assente dalla pianta a tutti i livelli esaminati, per poi colonizzarla progressivamente nell'arco dell'estate, con un picco massimo tra metà luglio e fine dicembre. In inverno la sua distribuzione è meno omogenea e più rarefatta e diminuisce con la degenerazione dei tubi floematici. Dalle osservazioni sulla dinamica di colonizzazione, è stato ipotizzato che il fitoplasma, mantenutosi vitale nelle radici durante la stagione invernale, possa migrare nel liquido floematico in maniera del tutto analoga a quella degli altri soluti seguendo il "flusso di massa" diretto agli organi in accrescimento (Seemüller *et al.*, 1984a e b)

Il fitoplasma AP non sembra interferire con la capacità fotosintetica nelle piante. Solo in autunno, con la comparsa dei tipici arrossamenti fogliari, i valori di FV/FM e SLA risultano significativamente inferiori nelle piante malate rispetto al testimone sano. Pertanto la riduzione della dimensione dei frutti non sembra essere imputabile all'incapacità della pianta di sintetizzare amido e zuccheri.

Parole chiave: Fitoplasma Apple Proliferation, Colonizzazione, Parametri fisiologici.

Summary

Seasonal colonization dynamic of Apple proliferation phytoplasma related to some physiological parameters in the plants

Apple Proliferation (AP) is a serious disease affecting apple trees in several fruit areas across Europe. Infected plants show a typical symptomatology: witches'-brooms, early leaf coloration in autumn, enlarged stipule and late blossoming (Giunchedi, 2003) and an overall reduced quali-quantitative yield. AP phytoplasma effects on plants physiology and growth are not very well-known. Nevertheless, it seems that this phytoplasma causes alterations in the photosynthetic activity and in the leaf metabolism (Bertamini *et al.*, 2002). In the present work the colonization dynamic and the distribution of AP phytoplasma was followed by DAPI staining in "Golden Delicious" apple trees cultivated in a valley floor environment in Trentino-Alto Adige. At the same time, at different levels on the same infected plants and on a healthy control, some physiological parameters, such as SPAD, quantum yield (FV/FM) and specific leaf area (SLA), were surveyed, in order to evaluate their possible interactions with the pathology. Indeed, all these parameters are correlated in different ways with the photosynthetic activity and the chlorophyll content of the plants. The research went on for two years (2003-2004). AP phytoplasma presence within the tree follows a typical seasonal trend: it is absent from the aerial part of the plant in all the examined levels in spring, whereas it reappears progressively during the summer, with a maximum peak between the middle of July and the end of December. Its distribution is less homogeneous and more rarefied in winter, decreasing with the sieve tubes degeneration. According to the observations on colonization dynamic, it was hypothesized that phytoplasma, surviving in the roots in wintertime, can migrate in the phloematic fluid such as the other solutes, following the mass flow directed to the growing organs (Seemüller *et al.*, 1984a e b).

AP phytoplasma seems not to interfere with the photosynthates production in plants. Only in fall FV/FM and SLA values result significantly lower in infected plants compared to the healthy witness. Therefore, size reduction in fruits is not attributable to the plant inability to synthesize starch and sugar.

Key words: Apple Proliferation phytoplasma, Colonization, Physiological parameters.

Lavori citati

- BERTAMINI M., K. MUTHUCHELIAN, M.S. GRANDO, N. NEDUNCHEZHIAN, 2002. Effects of phytoplasma infection on growth and photosynthesis in leaves of field grown apple (*Malus pumila* Mill. cv. Golden Delicious). *Photosynthetica*, **40** (1), 157-160.
- GIUNCHEDI L., 2003. Malattie da virus, viroidi e fitoplasmi degli alberi da frutto. Edagricole, Bologna
- SEEMÜLLER E., L. KUNZE, U. SCHAPER, 1984a. Colonization behaviour of MLO, and symptom expression of proliferation-diseased apple trees and decline-diseased pear trees over a period of several years. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, **91**, 525-532.
- SEEMÜLLER E., U. SCHAPER, F. ZIMBELMANN, 1984b. Seasonal variation in the colonization patterns of mycoplasma-like organisms associated with apple proliferation and pear decline. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, **91**, 371-382.

Lavoro svolto nell'ambito del Progetto SMAP, finanziato dal Fondo Unico per i Progetti di Ricerca della Provincia Autonoma di Trento, la cui coordinatrice scientifica è stata la dott.ssa M. Elisabetta Vindimian (1955-2004).

**MONITORAGGIO DEI GIALLUMI DELLA VITE E
CARATTERIZZAZIONE DEI FITOPLASMI NELL'AMBITO
DEL PROGETTO FINALIZZATO "GIA.VI" NEL 2004**

**M. Borgo¹, E. Angelini¹, L. Filippin¹, S. Botti², C. Marzachi³,
P. Casati⁴, F. Quaglino⁴, A. Zorloni⁴, G. Albanese⁵, R. La Rosa⁵,
M. Tessitori⁵, G. Pasquini⁶, A. Bertaccini²**

¹C.R.A. - Istituto Sperimentale per la Viticoltura,
Viale XXVIII Aprile, 26, I-31015 Conegliano (TV)

²Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali (DiSTA),
Università di Bologna, Viale Fanin, 44, I-40127 Bologna

³Istituto di Virologia Vegetale, CNR,
Strada delle Cacce, 73, I-10135 Torino

⁴Istituto di Patologia Vegetale, Università di Milano,
Via Celoria, 2, I-20133 Milano

⁵Dipartimento di Scienze e Tecnologie Fitosanitarie (DISTEF),
Università di Catania, Via S. Sofia, 100, I-95124 Catania

⁶C.R.A. - Istituto Sperimentale per la Patologia Vegetale,
Via C.G. Bertero, 22, I-00156 Roma

Il Progetto GIA.VI (GIAllumi della Vite), finanziato dal MiPAF per il triennio 2004-2006, prevede, fra le altre, le seguenti due tematiche di ricerca per lo studio dei giallumi della vite (GY):

- "monitoraggio dei GY nel territorio viticolo italiano", con l'obiettivo di definire una mappa di distribuzione dei fitoplasmi sul territorio;
- "studio dell'eziologia della malattia", mediante caratterizzazione degli isolati e dei ceppi di fitoplasmi associati ai giallumi individuati.

Nel corso del primo anno di attività del progetto sono stati monitorati circa 250 vigneti individuati in gran parte delle zone viticole italiane. La maggior parte dei vigneti sono stati scelti a partire da precedenti indagini, condotte da alcune Unità Operative afferenti al progetto, estendendo l'esame anche a nuovi ambienti viticoli, al fine di poter disporre di informazioni più dettagliate sulla distribuzione dei GY e sulla loro eziologia in ambito nazionale. I rilievi sono stati effettuati da luglio a ottobre, anticipati anche a giugno per alcuni vigneti, provvedendo alla raccolta di campioni di foglie da sottoporre alle analisi per la ricerca dei fitoplasmi. Sono stati analizzati complessivamente circa 500 campioni di vite, provenienti da tutte le regioni italiane, eccetto il Molise. Il DNA è stato purificato a seconda delle Unità Operative, seguendo diversi protocolli (Prince *et al.*, 1993; Barba *et al.*, 1998; Angelini *et al.*, 2001).

Le analisi sono state eseguite con tecniche PCR e RFLP. I casi di infezioni da Flavescenza dorata (FD) o da Legno nero (LN) o da FD+LN sono stati valutati mediante PCR diretta, utilizzando i “primers” universali P1/P7, e successiva “nested” PCR con “primers” specifici per il gruppo 16SrV ed i gruppi 16SrI/XII, effettuando in seguito un’analisi RFLP con le endonucleasi *BfaI* e *MseI*, rispettivamente. I campioni risultati positivi alla presenza di fitoplasmi del gruppo 16SrV sono poi stati riamplicati, secondo il protocollo descritto in Martini *et al.*, (2002), per individuare il sottogruppo ribosomico.

I risultati dei monitoraggi hanno messo in evidenza la presenza di viti con sintomi di GY in circa l’80% dei vigneti ispezionati nelle molteplici province indagate. Le analisi per la caratterizzazione dei fitoplasmi responsabili delle malattie hanno confermato la presenza del gruppo ribosomico 16SrXII-A, associato al Legno nero, in tutti gli ambienti. La presenza di Flavescenza dorata, sottogruppi 16SrV-C (FD-C) e 16SrV-D (FD-D) viene confermata nelle regioni settentrionali ed anche in alcuni ambienti del centro Italia. Si evidenzia un’ampia dispersione di entrambi i ceppi di flavescenza: FD-D risulta maggiormente diffusa rispetto a FD-C, che però si estende più a Sud rispetto ad FD-D, in considerazione del suo rinvenimento anche su campioni di viti sintomatiche raccolti in alcune province dell’Umbria e della Toscana. Sono apparsi interessanti anche i ritrovamenti sporadici di fitoplasmi appartenenti ad altri gruppi e precisamente: giallume dell’astro, sottogruppo 16SrI-B, “aster yellows”, in Lombardia, Liguria, Calabria e Sardegna, e sottogruppo 16SrI-C, “clover phyllody” in Lombardia e Abruzzo; giallume dell’olmo, sottogruppo 16SrV-A, “elm yellows”, in Lombardia ed in Emilia Romagna.

Parole chiave: Vite, Giallumi, Fitoplasmi, Flavescenza dorata, Legno nero.

Summary

Monitoring of grapevine yellow and molecular characterization of associated phytoplasmas in “GIA.VI” project during 2004

GIA.VI research plan (GIAllumi della Vite), financed by MiPAF for the years 2004-2006, is focalised on the study of grapevine yellows (GY) by means of several objectives. The work includes the following topics:

- “survey of Italian viticultural areas for the presence of GY”, in order to settle a map of phytoplasma distribution in Italy;
- “study of the aetiology of the yellows”, by means of the characterization of the strains associated to the different GY.

During the first year of activity about 250 vineyards, located in a great part of the Italian grape growing areas, were checked for yellows symptoms presence. Most part of the vineyards were selected according with previous surveys performed by some of the teams participating into the

project; new localities were also surveyed in order to obtain more detailed information about distribution and aetiology of GY in Italy. The surveys were carried out from July to October, in some cases also in June, and leaf samples were collected from symptomatic plants in order to perform phytoplasma detection and identification. About 500 samples from all Italian regions, except Molise, were tested; nucleic acid extraction was carried out by the different teams according with published protocols (Prince *et al.*, 1993; Barba *et al.*, 1998; Angelini *et al.*, 2001).

Molecular analyses were carried out by PCR/RFLP. Flavescence dorée (FD) or Bois noir (BN) or FD+BN infection were identified by direct PCR with universal primers P1/P7, followed by nested PCR with primers specific for ribosomal groups 16SrV and 16SrI/XII, and RFLP analyses with *Bfa*I and *Mse*I respectively. Samples positive to 16SrV group phytoplasmas were then amplified again, following the protocol described by Martini *et al.*, (2002), in order to identify ribosomal subgroups.

The results of surveys indicate the presence of GY symptoms in about 80% of the vineyards inspected. Phytoplasma molecular identification allowed confirming that BN phytoplasma is widespread in all the surveyed vineyards of Italy. Flavescence dorée presence, subgroups 16SrV-C (FD-C) and 16SrV-D (FD-D), was confirmed in Northern Italy regions and was detected also in some vineyards of Central Italy. It is worth noticing the wide spreading of both FD strains: FD-D appears to be more spread than FD-C, however the latter appears to spread towards the South more than FD-D, since it was identified also in symptomatic samples from some provinces of Umbria and Tuscany regions. Phytoplasmas belonging to other 16Sr groups were occasionally detected in symptomatic grapevines: aster yellows (16SrI-B) in Lombardy, Liguria, Calabria and Sardinia; clover phyllody (16SrI-C) in Lombardy and Abruzzo; elm yellows (16SrV-A) in Lombardy and Emilia Romagna.

Key words: Grapevine, Yellows, Phytoplasmas, Flavescence dorée, Bois noir.

Lavori citati

- ANGELINI E., D. CLAIR, M. BORGO, A. BERTACCINI, E. BOUDON-PADIEU, 2001. Flavescence 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.
- BARBA M., G. BOCCARDO, L. CARRARO, P. DEL SERRONE, P. ERMACORA, G. FIRRAO, L. GIUNCHEDI, N. LOI, M. MALFITANO, C. MARCONE, C. MARZACHÌ, R. MUSETTI, R. OSLER, S. PALMANO, C. POGGI POLLINI, C. RAGOZZINO, 1998. Confronto fra differenti tecniche di diagnosi applicate al rilevamento di fitoplasmi in pomacee. *Notiziario sulla Protezione delle Piante*, **9**, 263-277

- MARTINI M., S. BOTTI, C. MARCONE, C. MARZACHÌ, P. CASATI, P.A. BIANCO, A. BENEDETTI, A. BERTACCINI, 2002. Genetic variability among Flavescence dorée phytoplasmas from different origins in Italy and France. *Molecular and Cellular Probes*, **16**, 197-208.
- 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 mycoplasmalike organisms (MLOs) associated with grapevine yellows and their classification with aster yellows, X-disease and elm yellows MLOs. *Phytopathology*, **83**, 1130-1137.

Lavoro svolto nell'ambito del PF "I giallumi della vite: un fattore limitante per le produzioni vitivinicole", finanziato dal Ministero per le Politiche Agricole e Forestali.

Autore di riferimento: Michele Borgo - e-mail: michele.borgo@ispervit.it

**IDENTIFICAZIONE DI FITOPLASMI RISCOINTRATI IN VITI
AFFETTE DA GIALLUMI NELL'AMBITO DEI CONTROLLI
EFFETTUATI IN REGIONE LOMBARDIA DAL SERVIZIO
FITOSANITARIO NELL'ANNO 2004**

M. Calvi¹, B. Cavagna¹, M. Celè²

¹Direzione Generale Agricoltura Regione Lombardia,
Serv. Fitosanitario Regionale, V.le Raimondi, 56,
I-22070 Vertemate con Minoprio (CO)

²Direzione Generale Agricoltura Regione Lombardia,
Serv. Fitosanitario Regionale
c/o Università, Dipartimento Ecologia del Territorio,
Via S. Epifanio, 14, I-27100 Pavia

La presenza di Flavescenza dorata della vite in Lombardia è stata segnalata fin dalla fine degli anni sessanta (Oltrepò pavese, Belli *et al.*, 1973); a partire dal 1999 si è assistito ad un grave fenomeno di recrudescenza della malattia, che ha portato all'attuazione di un decreto di lotta obbligatoria (D.M. del 31 maggio 2000, pubblicato sulla G.U. n. 159 del 10.07.2000). Negli anni successivi le norme adottate per contenere la malattia hanno portato ad una riduzione drastica delle percentuali di piante colpite. Tuttavia la malattia è presente in tutte le aree viticole lombarde, in quanto anche in Valtellina nel corso dell'anno 2003 sono state ritrovate viti infette da fitoplasmi appartenenti al gruppo 16SrV-D. Per quanto riguarda il Legno Nero, si può dire che è costantemente presente nelle aree viticole lombarde, il fitoplasma agente appartenente al gruppo 16SrXII-A è stato riscontrato finora con una frequenza nettamente minore rispetto a FD, singolarmente o in doppia infezione insieme ad altri fitoplasmi responsabili di giallumi della vite. Nell'ambito dei rilievi sintomatologici effettuati nei vigneti, nell'annata da luglio a settembre 2004, da parte dei tecnici del Servizio Fitosanitario e dell'E.R.S.A.F., sono stati eseguiti campionamenti su piante sintomatiche allo scopo di identificare il fitoplasma responsabile. Sono stati sottoposti ad analisi 141 campioni provenienti dalle colline di San Colombano al Lambro (MI), Oltrepò mantovano, Oltrepò pavese, Garda bresciano, Franciacorta, Montevicchia (LC), Valtellina e Valcalepio (BG). La presenza del fitoplasma è stata messa in evidenza mediante amplificazione genica (PCR) di porzioni del gene 16S rDNA dei fitoplasmi, utilizzando per il primo ciclo di amplificazione le sequenze di innesco (primers) universali P1/P7 (Deng e Hiruki, 1991) e per un secondo ciclo di amplificazione sequenze specifiche per i gruppi tassonomici 16SrV, Elm Yellow, (Davis *et al.*, 2001) e 16SrXII, Stolbur (Davis *et al.*, 1997). L'identificazione dei fitoplasmi rilevati avveniva mediante analisi del polimorfismo dei frammenti di restrizione (RFLP) degli ampliconi di DNA, utilizzando gli enzimi di restrizione

MseI e *BfaI*. Su 141 campioni esaminati, circa l'82% dei campioni è risultato infetto da fitoplasmi, il 31% infetto da FD e circa 72% infetto da LN, con una percentuale di doppie infezioni del 3,4 %. Piante di vite infette da FD sono state riscontrate in tutte le aree viticole con frequenza assai variabile a seconda delle zone, tranne in Valtellina dove non sono stati ritrovati nuovi casi, pur confermandosi la presenza di LN. Numerosi casi di FD sono stati riscontrati nei vigneti di San Colombano al Lambro dove si è rilevata anche una buona presenza dell'insetto vettore *Scaphoideus titanus*. Mentre in Oltrepò pavese si conferma la tendenza in diminuzione della malattia, così come anche nelle aree viticole della provincia di Bergamo e Brescia. In queste zone il numero di casi di LN riscontrati ha superato di molto i casi di FD, particolare è la situazione della Franciacorta e del Garda bresciano dove pressoché la totalità dei campioni sintomatici è risultata infetta da LN, ritrovato frequentemente anche in impianti giovani, soprattutto di viti di varietà Chardonnay. Per l'annata in corso ci si propone un monitoraggio più ampio, che comprenda un numero maggiore di vigneti, unito ad un campionamento numericamente più rappresentativo allo scopo di chiarire maggiormente la distribuzione attuale dei giallumi nella regione in particolare alla luce dell'aumento dei casi di LN rispetto ai casi di FD.

Per quanto riguarda il materiale di moltiplicazione di vite in Lombardia, il SFR è incaricato dell'attività di controllo, conformemente alle normative vigenti comunitarie e nazionali. La presenza di FD sul territorio viticolo lombardo ha richiesto l'attento controllo dei campi di PMM (piante madri marze) e PMP (piante madri portainnesto), di conseguenza negli anni dal 1999 al 2002 l'applicazione rigorosa della lotta obbligatoria ha determinato una forte contrazione della superficie consentita per i prelievi di materiale. In Oltrepò pavese l'applicazione delle misure di quarantena dei campi di PMM ha inciso particolarmente sulla disponibilità di materiale di varietà autoctone (Uva rara, Croatina). In questi anni i provvedimenti messi in atto per prevenire la diffusione della malattia e dell'insetto vettore, hanno permesso di ridurre notevolmente la presenza delle infezioni nei campi destinati alla raccolta del materiale di moltiplicazione. A partire dal 2003 i dati indicano che le superfici destinate al vivaismo viticolo stanno gradualmente ritornando ai livelli precedenti all'esplosione dell'epidemia.

Parole chiave: Flavescenza Dorata, Legno nero, Regione Lombardia, Servizio Fitosanitario.

Summary

Identification of phytoplasmas detected in grapevines showing yellows symptoms during the 2004 survey program carried out by the Lombardia Region phytosanitary service

The grapevine disease Flavescence Dorée was described in Lombardia region since the end of '60 (Oltrepò pavese, Belli *et al.*, 1973), later starting

from 1999 was observed a severe occurrence of the disease, for this reason a national decree concerning the compulsory control of FD had been taken (D.M. del 31 maggio 2000, pubblicato sulla G.U. n. 159 del 10.07.2000). In the subsequent years the measures gave a great decreasing of the percentage of infection. Actually the disease is widely distributed in Lombardia, also in Valtellina during 2003 were founded grapevines infected by phytoplasmas belonging to 16SrV-D group. Bois noir was constantly reported in this area, the phytoplasma involved belong to the 16SrXII-A group, was founded in a clearly low frequency than FD, in single infection or together with other grapevine yellows phytoplasmas. During the observation of the symptoms in vineyards, from July to September 2004, Plant Protection Service and E.R.S.A.F. technicians sampled symptomatic plants for the identification of the phytoplasmas involved. 141 samples were examined coming from S.Colombano hills, Oltrepò mantovano, Oltrepò pavese, Garda bresciano, Franciacorta, Montevicchia (LC), Valtellina e Valcalegio (BG). The primers pairs PIP7 (Deng e Hiruki, 1991), designed for universal amplification of 16S rDNA gene from all known phytoplasmas was used for a first round of PCR test. A second round of PCR test was realized using primers pairs designed for 16SrV, Elm Yellow (Davis *et al.*, 2001), and 16SrXII, Stolbur phytoplasma group (Davis *et al.*, 1997). RFLP analysis using restriction enzymes *MseI* and *BfaI* have been carried out to identify phytoplasmas. In total 141 grapevine were examined, 82% of samples was found infected by phytoplasma, 31% was positive to FD, 72% positive to BN. Grapevine infected by FD was found in all the zones with different levels of frequency, but no new infection of FD was found in Valtellina, where BN was still present. New infections were found in S. Colombano hills where population of the insect vector *Scaphoideus titanus* was still present. In Oltrepò pavese, Brescia and in Valtenesi the disease rate was decreasing. In particular in these zone the number of samples founded infected by BN was more than those infected by FD. For the coming year the aim is to keep on monitoring the rate of the diffusion of grapevine yellows and to survey the possible increasing of BN.

Concerning grapevine propagative material, in Lombardia the Plant Protection Service is encharged to control activity in nurseries, in according to present comunitary and national dispositions. The presence of the FD disease in Lombardia required a careful control on nursery stock fields, consequently from 1999 to 2002 the eradication procedure made a strong reduction of nurseries. In particular in Oltrepò Pavese the compulsory control caused a decrease of the healthy propagative material of local varieties (Uva rara, Croatina). During the last years the measures taken against the diffusion of the disease and the spread of the insect vector, allowed the decreasing of the infection in nursery stock. Starting from 2003 the data show that the vine nurseries areas are gradually increasing and reaching the level before the raising of the disease

Key words: Flavescence Dorée, Bois Noir, Lombardia region, Phytosanitary Service.

Lavori citati

- BELLI G., A. FORTUSINI, R. OSLER, A. AMICI, 1973. Presenza di una malattia del tipo "Flavescence Dorée" in vigneti dell'Oltrepò pavese. *Petria*, **9** (Suppl. **1**), 51-56.
- DENG S., C. HIRUKI, 1991. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and non-culturable Mollicutes. *Journal of Microbiological Methods*, **14**, 53-61.
- DAVIS E.R., E.L. DALLY, 2001. Revised subgroup classification of group 16SrV phytoplasmas and placement of Flavescence dorée associated phytoplasmas in two distinct subgroups. *Plant disease*, **85**, 790-796.
- DAVIS E.R., E. TANNE, I.C. RUMBOS, 1997. Phytoplasmas associated with grapevine yellows in Israel and Greece belong to the stolbur phytoplasma subgroup, 16SrXII-A. *Journal of Plant Pathology*, **79**, 181-187.

TRASMISSIONE DI APPLE PROLIFERATION TRAMITE ANASTOMOSI RADICALI

**A.M. Ciccotti, P.L. Bianchedi, P. Bragagna, M. Deromedi,
M. Filippi, F. Forno, L. Mattedi**

Istituto Agrario San Michele all'Adige,
Via Mach 1, I-38010 San Michele all'Adige (TN)

La fitoplasmosi "Apple Proliferation" (AP) può essere trasmessa artificialmente e con efficacia tramite innesto di radice, tanto che quest'ultimo era stato proposto in passato come metodo di saggio per AP (Kunze, 1989). Numerose osservazioni della presenza della malattia in piante contigue sulla fila o disposte a macchia, soprattutto nel caso di impianti meno giovani, hanno indotto ad ipotizzare la possibilità della diffusione di AP tramite anastomosi radicali naturali (Bliefernicht and Krczal, 1995). A sostegno di ciò sono anche i frequenti casi di formazione di innesti di radici tra piante vicine, sia di età avanzata, che più giovani, riscontrati durante gli espianti e/o gli scavi eseguiti attorno a piante vicine, sia in vivaio che in campo. Nei frutteti di media-elevata età del Trentino tale fenomeno sembra giocare un ruolo non indifferente (Vindimian, 2002). Applicazioni con un erbicida sistemico fatte esclusivamente sulla superficie di piante infette hanno causato manifestazione di sintomi da diserbo anche sulle piante vicine a quelle trattate facendo ipotizzare, anche in tal caso, la possibilità di una traslocazione del prodotto tramite anastomosi radicali (Vindimian *et al.*, 2002).

Per verificare la possibilità di trasmissione di AP tramite "ponti radicali" indotti o naturali, è stata allestita una prova sperimentale in ambiente controllato. 60 piante di melo franco da seme di un anno, sane, sono state poste a due a due in vasi da 12 litri e le loro radici fatte passare attraverso un tubicino di plastica trasparente (1 cm diam e 5 cm lungo) al fine di provocare un contatto permanente. L'inoculo con il fitoplasma è avvenuto tramite innesto per approssimazione su una delle due piante sane utilizzando una pianta micropropagata infetta da AP posta in un vaso attiguo. A distanza di due anni solo in 1 vaso (3,3%) entrambe le piante hanno manifestato netti sintomi della malattia. Specifiche diagnosi con ELISA test e Immunofluorescenza (IF) hanno confermato la presenza di AP. All'esame delle radici si è riscontrata una anastomosi spontanea tra di esse, ma non nella zona di "contatto indotto". Osservazioni istologiche hanno evidenziato la connessione dei tessuti e il fitoplasma è stato rilevato nei tubi floematici di entrambe le piante tramite immunofluorescenza. L'esperienza ha potuto verificare per la prima volta la possibilità di trasmissione del fitoplasma AP attraverso ponti radicali naturali.

Parole chiave: Scopazzi del melo (AP), Trasmissione , Anastomosi radicali.

Summary

Experimental transmission of Apple proliferation by root Bridges

Apple Proliferation (AP) phytoplasma can be transmitted artificially and effectively by root grafting. Indeed, it was proposed as test method for AP in the past (Kunze, 1989). The presence of AP in trees located in the same row or in patches in affected orchards, especially in the case of old plantations, led to suppose the existence of natural grafts in the roots of neighbouring trees and the spread of AP by these bridges (Blieferricht and Krczal, 1995). Frequent root grafts in neighbouring trees, both in old and in younger ones, were found during uprootings and/or excavations made around plants in nurseries and orchards. In medium-aged or old orchards in Trentino this phenomenon seems to play an important role (Vindimian, 2002). Trials applying a systemic herbicide exclusively on the cut surface of infected trees caused herbicide symptoms in neighbouring trees presumably by compound translocation through a root bridge (Vindimian *et al.*, 2002).

In order to verify the possible transmission of AP phytoplasma by natural or driven root bridges, a trial was conducted under controlled conditions. 60 healthy one year old apple seedlings were put two by two in 12 litres pots. Their roots were inserted in a plastic hose (1 cm diameter and 5 cm length) to create a permanent contact. Phytoplasma inoculum took place by roughly graft between one of the two plants and a micropropagated infected plant placed in another pot. After two years only in one pot (3,3 %) both the plants showed clear symptoms of the disease. AP phytoplasma-specific ELISA test and Immunofluorescence (IF) diagnosis confirmed the presence of AP phytoplasmas in the plants. Examining the roots, a spontaneous anastomosis was found, but not in the "induced contact" area. Histological observations confirmed a tissue connection of sieve tube elements and AP phytoplasmas could be detected in these sieve tubes by IF studies. Thus, AP phytoplasma transmission by natural root bridges could be experimentally demonstrate for the first time.

Key words: Apple proliferation (AP), Transmission, Root bridges.

Lavori citati

- BLIEFERNIGHT K., L.G. KRCZAL, 1995. Epidemiological studies on Apple proliferation disease in southern Germany. *Acta Horticulturae*, **386**, 444 -447
- KUNZE L., 1989. Apple Proliferation. *In: Virus and viruslike diseases of pome fruit and simulating noninfectious disorders.* (Fridlund P.R., ed.), 99-113. Cooperative Extension College of Agriculture and Home Economics, Washington St. Univ., Pullmann, WA.

- VINDIMIAN M.E., 2002. Scopazzi del melo: diffusione in Trentino e ricerche *in atto*. *Atti giornate fitopatologiche, 2002, Belsega di Pinè, 7-11 aprile 2002*, Bologna. *Clueb*, vol. **1**, 7-12
- VINDIMIAN M.E., A.M. CICCOTTI, M. FILIPPI, M. SPRINGHETTI, M. DEROMEDI, 2002. Trasmissione di Apple Proliferation (AP) tramite anastomosi radicali. *In: Atti del "Workshop": Il Incontro nazionale sulle malattie da fitoplasmi (a cura di M. Barba)*, Roma, Italy, 3-4 ottobre. *Petria*, **12**, (3), 375 pp.

Lavoro svolto nell'ambito del Progetto SMAP, finanziato dal Fondo Unico per i Progetti di Ricerca della Provincia Autonoma di Trento, la cui coordinatrice scientifica è stata la dott.ssa M. Elisabetta Vindimian (1955-2004).

MONITORAGGIO DEI GIALLUMI DELLA VITE IN ABRUZZO

**D. D'Ascenzo¹, S. Murolo², R. Di Giovanni¹,
B.M. Branzanti², G. Romanazzi²**

¹Servizio Fitosanitario Regionale, ARSSA, Regione Abruzzo,
Via Nazionale, 38, I-65012 Villanova di Cepagatti (PE)

²Dipartimento di Scienze Ambientali e delle Produzioni Vegetali,
Università Politecnica delle Marche, Via Brecce Bianche, I-60131 Ancona

I fitoplasmi associati ai “giallumi della vite” presenti in Italia fanno capo a cinque gruppi tassonomici (Lee *et al.*, 1998): 16SrI (Giallume dell’astro, AY); 16SrIII (Malattia X, XD); 16SrV (Giallume dell’olmo, EY), al quale appartiene la Flavescenza Dorata (FD); 16SrX (Scopazzo del melo, AP); 16SrXII (Stolbur), al quale appartiene l’agente del Legno Nero (LN). In base all’ultima classificazione, i fitoplasmi in grado di causare i maggiori danni sulla vite, agenti di FD e LN, sono stati denominati rispettivamente “*Candidatus* Phytoplasma ulmi” e “*Candidatus* Phytoplasma solani” (Firrao *et al.*, 2004). La FD è una malattia da quarantena, soggetta a lotta obbligatoria.

La viticoltura ha una notevole rilevanza economica nella Regione Abruzzo, sia per la produzione di vini di pregio sia per la presenza di numerosi campi di piante madri per la produzione di materiale di propagazione. Pertanto, risulta importante il monitoraggio per la ricerca di fitoplasmi agenti di giallumi della vite in generale e di FD in particolare. L’attività svolta negli anni scorsi, condotta nelle province di Chieti, Pescara e Teramo, ha evidenziato la diffusa presenza di LN e sporadici rinvenimenti di fitoplasmi appartenenti al sottogruppo 16SrI-C, mentre non sono stati rinvenuti casi di FD (D’Ascenzo *et al.*, 2003). Obiettivi della presente ricerca, condotta nel corso del 2004 sono stati il monitoraggio dei giallumi della vite nei vigneti commerciali e nei campi di piante madri e l’identificazione dei fitoplasmi associati alle piante sintomatiche. Le analisi molecolari sono state effettuate estraendo il DNA totale dalle nervature fogliari di piante con sintomi e amplificandolo mediante nested-PCR, secondo le modalità già riportate (Romanazzi *et al.*, 2004). I prodotti finali di reazione sono stati poi sottoposti a digestione enzimatica (*MseI*) per evidenziare il polimorfismo dei frammenti di restrizione (RFLP), visualizzandoli su gel di poliaccrilammide previa colorazione con nitrato di argento. Le analisi svolte hanno evidenziato la diffusa presenza del fitoplasma del LN in diversi vigneti commerciali localizzati prevalentemente nella Valle Peligna (AQ), mentre non sono stati rinvenuti casi di FD.

Parole chiave: Vite, Fitoplasmi, Nested-PCR, RFLP.

Summary

Survey of grapevine yellows in Abruzzo region

Phytoplasmas associated to “grapevine yellows” found in Italy are classified in five taxonomic groups (Lee *et al.*, 1998): 16SrI (Aster Yellows, AY); 16SrIII (X-Disease, XD); 16SrV (Elm Yellows, EY), at which belongs the Flavescence Dorée (FD); 16SrX (Apple Proliferation, AP); 16SrXII (Stolbur), including the causal agents of Bois Noir (BN). According to a recent classification, the phytoplasmas causing the main disease on grapevine, causal agents of FD and BN, are called “*Candidatus Phytoplasma ulmi*” and “*Candidatus Phytoplasma solani*”, respectively (Firrao *et al.*, 2004). FD is a quarantine disease, that is subject to mandatory control. Viticulture has a relevant economic importance in Abruzzo Region, both for the production of good wines and for mother plant plots for production of propagative material. Then, the survey for the search of phytoplasmas inducing grapevine yellows in general and FD in particular is worthwhile. The investigations carried out in last years in the Chieti, Pescara, and Teramo provinces showed the presence of BN in several vineyards, a lower number resulted infected by phytoplasmas belonging to the subgroup 16SrI-C, whereas any infection of FD was found (D’Ascenzo *et al.*, 2003). The aims of this research, carried out during 2004, were the survey of grapevine yellows in commercial vineyards and in mother plant plots and the identification of phytoplasmas associated to symptomatic plants. Molecular analysis were performed by extracting total DNA from leaf veins of plants showing symptoms, that was amplified by nested-PCR, as already reported (Romanazzi *et al.*, 2004). Reaction products were digested with endonucleases for fragment length polymorphism (RFLP) and visualized on polyacrilamide gel stained with silver nitrate. The analysis showed the presence of BN in several commercial vineyards located mainly in Peligna Valley (AQ). No FD infections were identified in the sample analysed.

Key words: Grapevine, Phytoplasmas, Nested-PCR, RFLP.

Lavori citati

- D’ASCENZO D., S. BOTTI, S. PALTRINIERI, R. DI GIOVANNI, D. DI SILVESTRO, A. BERTACCINI, 2003. Identification of phytoplasmas associated with grapevine yellows in Abruzzo region (Italy). Extended abstracts 14th Meeting of the International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine (ICVG) - Locorotondo (BA), 89-90.

- FIRRAO G., C. MARCONE, A. BERTACCINI, 2004. Phytoplasma classification. *Journal of Plant Pathology*, **86** (4), 299.
- 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.
- ROMANAZZI G., S. MUROLO, L. LANDI, M.B. BRANZANTI, O. SILVESTRONI, V. SAVINO, 2004. Giallumi della vite nelle Marche. *Atti Giornate Fitopatologiche*, (2), 353-358.

Autore di riferimento: Gianfranco Romanazzi Tel. 071/2204336 - e-mail: romanazzi@univpm.it

INDAGINE EPIDEMIOLOGICA IN UN VIGNETO AFFETTO DA “LEGNO NERO” NEL NORD-SARDEGNA

**R. Garau¹, V.A. Prota¹, A. Sechi¹, A. Lentini¹,
S. Botti², G. Tolu¹, A. Bertaccini²**

¹Dipartimento di Protezione delle Piante, Sez. di Patologia Vegetale
e di Entomologia Agraria, Università di Sassari,
Via E. De Nicola, 1, I-07100, Sassari

²Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali (DiSTA),
Università di Bologna, Viale Fanin, 44, I-40127 Bologna

Nel nord Sardegna, in un vigneto bivarietale di Chardonnay e Vermentino, affetto da “legno nero” è stato condotto uno studio epidemiologico finalizzato alla evidenza di specie di cicaline potenziali mediatori di Stolbur. Nel biennio 2003-2004, sono state monitorate, da aprile a novembre, popolazioni di Auchenorrhinchi mediante retino da sfalcio. Sono stati catturati delfacidi (*Laodelphax striatellus*), un cercopide, cicadellidi deltocefalini (*Agallia ribauti*, *Eupelix cuspidata*, *Euscelis lineolatus*, *Euscelidius variegatus*, *Exitianus taeniaticeps*, *Goniagnathus guttulinervis*, *Neodliturus fenestratus*, *N. guttulatus*, *Phlepsius intricatus*, *Psammotettix alienus* e *Tamnotettix zelleri*) e tiflocibini (*Empoasca vitis* e *Zyginidia scutellaris*). Le indagini molecolari (PCR ed RFLP) condotte su campioni di insetti, sono state finalizzate, nel 2003, ad evidenziare la presenza di fitoplasmi del gruppo 16SrXII-A; nel 2004 la diagnosi è stata estesa anche ad altri gruppi di fitoplasmi.

Complessivamente, sono stati sottoposti ad amplificazione genica 121 campioni appartenenti a 9 differenti specie.

Nel 2003, previa estrazione del DNA, si è proceduto ad una prima amplificazione in PCR con i “primers” universali R16F2/R2 e ad una “nested” PCR con gli specifici R16(I)F1/R1 (Lee *et al.*, 1995). Gli ampliconi sono stati digeriti con l’endonucleasi di restrizione *MseI*, sottoposti ad elettroforesi in gel di agarosio al 2% ed osservati in GEL DOC.

Nel 2004 il DNA estratto è stato avviato ad una PCR diretta con P1/P7 seguita da due “nested”-PCR: la prima utilizzando i “primers” F1/B6, la seconda con R16 F2/R2 (Duduk *et al.*, 2004). L’amplificato, digerito in RFLP con *TruI*, *RsaI* ed *SspI* e sottoposto ad elettroforesi in gel di poliacrilammide al 5%, è stato visualizzato in un transilluminatore ad UV. Sono risultate infette le specie: *G. guttulinervis*, in settembre da fitoplasmi 16SrXII-A (sottogruppo Stolbur) (Garau *et al.*, 2004); *E. lineolatus*, allo stato preimmaginale nei mesi di maggio e di adulto in giugno, e *L. striatellus* in ottobre, da fitoplasmi 16SrI-C (ceppo di riferimento “Clover phyllody”); *P. alienus*, è risultata infetta, da fitoplasmi 16SrI-C e 16SrI-B, mai in infezione mista. Un Cercopide è risultato positivo al fitoplasma 16SrX-A (ceppo di riferimento “Apple proliferation”) nel mese di luglio.

P. alienus risulterebbe, a nostra conoscenza, un nuovo ospite naturale di fitoplasm 16SrI-C e 16SrI-B del gruppo “Aster yellows”.

Preliminari saggi molecolari, eseguiti su piante di Chardonnay, hanno evidenziato la presenza di fitoplasm 16SrI-B, indicando un verosimile coinvolgimento della vite nel ciclo ecologico di questo fitoplasma nel vigneto in studio. Nessuna positività è stata ottenuta dai campioni prelevati dalla flora spontanea relativamente ai patogeni considerati.

Parole chiave: Vite, Stolbur, Auchenorrhinchi, Epidemiologia.

Summary

Epidemiological study in a vineyard of north Sardinia affected by “Bois noir”

An epidemiological study aimed to identify potential vectors was carried out on a Vermentino and Chardonnay vineyard in north Sardinia (Italy) which was affected by “Bois noir” phytoplasma disease.

The Auchenorrhyncha populations were monitored from April to November in 2003 and 2004, using sweep net. The following insects were captured: Delphacidae (*Laodelphax striatellus*), a Cercopidae, Cicadellidae Deltoccephalinae (*Agallia ribauti*, *Eupelix cuspidata*, *Euscelis lineolatus*, *Euscelidius variegatus*, *Exitianus taeniaticeps*, *Goniagnathus guttulinervis*, *Neotalitrus fenestratus*, *N. guttulatus*, *Phlepsius intricatus*, *Psammotettix alienus* and *Tamnotettix zelleri*) and Typhlocybininae (*Empoasca vitis* and *Zyginidia scutellaris*). In 2003 the molecular analysis (PCR and RFLP), carried out on insects samples, were aimed to assess the presence of the 16SrXII-A phytoplasma group, while in 2004 the detection was also extended to other groups.

In total, 121 DNA samples belonging to 9 species of leafhoppers were amplified and digested with the *MseI* restriction endonuclease. In 2003 the DNA was extracted and amplified in direct PCR with the universal primers R16F2/R2, then a nested PCR with the specific primers R16(I)F1/R1 (Lee *et al.*, 1995) was carried out. The amplified products were digested with the *MseI* restriction endonuclease, electrophoresed in agarose gel at 2% and visualised in a GEL DOC.

In 2004 the extracted DNA was amplified in direct PCR with P1/P7, followed by two nested-PCR. The primers used in the first round were F1/B6 and in the second R16 F2/R2 (Duduk *et al.*, 2004). The amplified products were digested with *TruI*, *RsaI* and *SspI*, and then after electrophoresed in polyacrylamide gel at 5%, were visualised in an UV transilluminator.

Results showed that the following species were infected: *G. guttulinervis*, in September was infected by 16SrXII-A phytoplasma, “Stolbur” group (Garau *et al.*, 2004); *E. lineolatus* in the preimaginal state in May and in the adult form in June and *L. striatellus* in October were infected by a 16SrI-C phytoplasmas, “Aster yellows” group. *P. alienus* was infected in different samples by phytoplasmas 16SrI-C and 16SrI-B. A Cercopidae was positive to 16SrX-A phytoplasmas, “Apple proliferation” group, in July. *P. alienus* is here reported as a new natural host for two “Aster yellows” phytoplasma subgroup, 16SrI-C and 16SrI-B.

Preliminary detection on samples from Chardonnay plants showed presence of 16SrI-B phytoplasma, which indicate that the grapevine is probably involved in the lifecycle of this prokaryote in this specific environment. No positive results were obtained from spontaneous flora for the pathogens under investigation.

Key words: Grapevine, Stolbur, Auchenorrhyncha, Epidemiology.

Lavori citati

- DUDUK B., S. BOTTI, M. IVANOVIC, B. KRSTIĆ, N. DUKIĆ, A. BERTACCINI, 2004. Identification of phytoplasmas associated with grapevine yellows in Serbia. *Journal of Phytopathology*, **152**, 575-579.
- GARAU R., A. SECHI, G. TOLU, V.A. PROTA, A. LENTINI, U. PROTA, 2004. *Goniagnathus guttulinervis* (Kirschbaum), new natural host of the stolbur subgroup 16SrXII-A phytoplasma in Sardinia. *Journal of Plant Phytopatology*, **86** (2), 179.
- LEE I.-M., A. BERTACCINI, M. VIBIO, D.E. GUNDERSEN-RINDAL, 1995. Detection of multiple phytoplasmas in perennial fruit trees with decline symptoms in Italy. *Phytopathology*, **85**, 728-735.

Ringraziamenti

Si ringrazia il Prof. Alberto Alma (Di.Va.P.R.A., Università di Torino) per l'identificazione di *P. alienus*.

Lavoro svolto con il contributo del MiUR (ex 60%) nell'ambito della ricerca “Presenza e diffusione dei giallumi della vite in Sardegna”.

**INDAGINI SULLA PRESENZA DELLA FLAVESCENZA
DORATA DELLA VITE E DI *SCAPHOIDEUS TITANUS*
IN BASILICATA**

C. Marcone¹, I. Camele¹, V. Castoro², R. Spicciarelli¹

¹Dipartimento di Biologia, Difesa e Biotecnologie Agro-Forestali,
Università della Basilicata, Viale Ateneo Lucano, 10, I-85100 Potenza

²Ufficio Fitosanitario, Dipartimento Agricoltura e Sviluppo Rurale,
Regione Basilicata, Via Dante, 15, I-75100 Matera

La flavescenza dorata (FD) della vite è uno dei vari giallumi della vite (grapevine yellows = GY) i quali costituiscono un complesso di malattie di natura fitoplasmatica caratterizzate da sintomi identici ma che differiscono per il tipo di fitoplasma associato, l'insetto vettore responsabile della trasmissione in natura nonché per la distribuzione geografica. Essa è causata da fitoplasmi appartenenti al gruppo filogenetico del giallume dell'olmo (elm yellows = EY = 16SrV) ed ai sottogruppi 16SrV-C e 16SrV-D. È presente nella Francia meridionale, nella Spagna e Italia settentrionali e in Serbia e riveste notevole importanza in diverse aree viticole ove assume carattere fortemente epidemico (Martini *et al.*, 2002; Duduk *et al.*, 2004). In Italia, la FD è stata rinvenuta anche in un vigneto delle Marche ove sembra non rivestire carattere epidemico (Credi *et al.*, 2002). I fitoplasmi FD sono trasmessi in natura dal cicadellide *Scaphoideus titanus* Ball. Questo vettore, di origine nord americana, sta progressivamente espandendo sia verso nord che verso sud il suo areale di distribuzione in Europa, ritenuto in passato costituito dalla fascia a ridosso del 45° parallelo e che si estende inoltre dall'Atlantico ai paesi dell'ex Jugoslavia. Infatti, nel corso dell'ultimo decennio *S. titanus* è stato anche rinvenuto nella Borgogna s e t t e ntrionale (Francia) e Svizzera occidentale nonché in Corsica, Portogallo, Spagna settentrionale e in varie regioni dell'Italia centro-meridionale quali Toscana, Umbria e Basilicata (Viggiani, 2002; Boudon-Padieu, 2003). Sebbene l'area di diffusione e di rilevanza economica di FD sia considerevolmente inferiore a quella di distribuzione di *S. titanus*, tale ampelopatia tende ad interessare nuove aree viticole, soprattutto se già infestate da *S. titanus*. Nel 2002, in Basilicata, in un vigneto ubicato in agro di Rivello (Potenza) sono stati rinvenuti adulti e stadi giovanili di *S. titanus* (Viggiani, 2002). È per tale ragione che si è ritenuto opportuno valutare la reale diffusione di *S. titanus* nelle più importanti aree viticole lucane e verificare, mediante le tecniche molecolari di PCR ed RFLP, l'eventuale presenza dei fitoplasmi FD sia in piante di vite che in esemplari dell'insetto vettore catturati.

Un totale di 163 adulti di *S. titanus* è stato collezionato mediante l'ausilio di trappole cromotropiche in 15 vigneti ubicati in agro di Rivello, nel periodo luglio - ottobre del 2004. Questo cicadellide non è stato rinvenuto negli altri vigneti esaminati

(44), nel periodo suddetto, ubicati in 18 comuni appartenenti sia alla provincia di Potenza che di Matera. Le osservazioni di campo hanno evidenziato che tipici sintomi di GY erano presenti soltanto in vigneti, già segnalati in passato, affetti dal fitoplasma stolbur (Marcone *et al.*, 2002). Questi sintomi, invece, non erano evidenti negli altri vigneti esaminati, compresi quelli infestati da *S. titanus*.

Per lo svolgimento delle tecniche molecolari di PCR ed RFLP sono stati estratti campioni di DNA da piccioli e nervature fogliari di piante sintomatiche e apparentemente sane nonché da insetti singoli o riuniti in gruppi di 2 - 5 esemplari. L'estrazione del DNA da piante è stata condotta seguendo il protocollo di Ahrens e Seemüller (1992) mentre quella da insetti, secondo il protocollo di Doyle e Doyle (1990). Per la PCR, sono stati impiegati sia i primer universali P1/P7, i quali amplificano l'intera sequenza del gene 16S e la regione spaziatrice situata tra tale gene e il gene 23S di tutti i fitoplasmi finora noti (Schneider *et al.*, 1995) sia gli iniziatori specifici fStol/rStol che amplificano un frammento di circa 620 paia di basi (bp) dei fitoplasmi del gruppo stolbur (= 16SrXII) (Maixner *et al.*, 1995) e fB1/rULW che amplificano un frammento di circa 1650 bp dei fitoplasmi del gruppo EY (Marcone *et al.*, 1996). Al fine di aumentare la sensibilità della tecnica PCR, sono stati eseguiti anche esperimenti di nested PCR, in cui il prodotto di amplificazione ottenuto con i primer P1/P7 è stato riamplicato con i suddetti primer specifici.

Visibili prodotti di amplificazione sono stati ottenuti da campioni di DNA estratti da 20 piante di vite "Chardonnay" manifestanti sintomi di GY collezionate in agro di Matera. Sulla base della specificità dei primer impiegati e dell'analisi RFLP condotta impiegando 9 diverse endonucleasi di restrizione, queste infezioni fitoplasmatiche sono attribuibili a fitoplasmi del gruppo stolbur. I rimanenti campioni estratti da vite e tutti quelli ottenuti da cicaline hanno reagito negativamente.

Parole chiave: Giallumi della vite, Flavescenza dorata, *Scaphoideus titanus*, Fitoplasmi.

Summary

Survey of Flavescence dorée of grapevine and *Scaphoideus titanus* in Basilicata (southern Italy)

Flavescence dorée (FD) of grapevine is one of the most serious grapevine yellows (GY) diseases. It is caused by phytoplasmas of the elm yellows (EY = 16SrV) phylogenetic group, subgroups 16SrV-C and 16SrV-D. At present FD is known to occur in southern France, northern Spain, northern Italy and Serbia. FD phytoplasmas have also been detected in GY-affected grapevines in the Marche region (central Italy) where the incidence of FD agents seems to be low.

FD phytoplasmas are transmitted in nature by the leafhopper *Scaphoideus*

titanus. This vector, native to North America, is progressively extending the northern and southern border of its geographic distribution in Europe. Recently, it has been recorded also in some regions of central and southern Italy such as Tuscany, Umbria and Basilicata. Although the area of distribution and economic importance of FD is considerably smaller than the geographic distribution of *S. titanus*, the disease is spreading into new viticultural areas, especially if they are already infested by *S. titanus*. Therefore, a survey was carried out to determine the distribution of *S. titanus* and the occurrence of FD phytoplasmas in the most important viticultural areas of Basilicata. A total of 163 adults of *S. titanus* was collected by sticky traps in 17 vineyards located in Rivello areas (Potenza) from July through October 2004. This leafhopper was not found in all other vineyards examined (44). Extensive visual inspections revealed that symptoms typical of GY diseases were present only in vineyards which had already been reported to be affected by stolbur phytoplasmas. These symptoms were not present in the remaining vineyards including those infested by *S. titanus*. PCR assays carried out using universal and group-specific phytoplasma primers did not reveal the presence of FD phytoplasmas in the collected leafhoppers as well as in Lucanian grapevines. Samples taken from 20 grapevines showing GY symptoms, from Matera areas, proved to be infected by stolbur agents.

Key words: Grapevine yellows, Flavescence dorée, *Scaphoideus titanus*, Phytoplasmas.

Lavori citati

- AHRENS U., E. SEEMÜLLER, 1992. Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology*, **82**, 828-832.
- BOUDON-PADIEU E., 2003. The situation of grapevine yellows and current research directions: distribution, diversity, vectors, diffusion and control. Proceedings 14th ICVG Conference, Locorotondo, Italy, 12-17 Sept. 2003, 47-53.
- CREDI R., F. TERLIZZI, G. STIMILLI, S. NARDI, R. LAGNESE, 2002. Flavescenza Dorata della vite nelle Marche. *L'Informatore Agrario*, **58**, 61-63.
- DOYLE J.J., J.L. DOYLE, 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus (Life Technologies Inc.)*, **12**, 13-15.
- DUDUK B., S. BOTTI, M. IVANOVIC, B. KRSTIC, N. DUKIC, A. BERTACCINI, 2004. Identification of phytoplasmas associated with grapevine yellows in Serbia. *Journal of Phytopathology*, **152**, 575-579.
- MAIXNER M., U. AHRENS, E. SEEMÜLLER, 1995. Detection of the German grapevine yellows (Vergilbungskrankheit) MLO in grapevine, alternative hosts and a vector by a specific PCR procedure. *European Journal of Plant Pathology*, **101**, 241-250.

- MARCONE C., A. RAGOZZINO, B. SCHNEIDER, U. LAUER, C. D. SMART, E. SEEMÜLLER, 1996. Genetic characterization and classification of two phytoplasmas associated with spartium witches'-broom disease. *Plant Disease*, **80**, 365-371.
- MARCONE C., G. SCAGLIONE, I. CAMELE, A. RAGOZZINO, G. L. RANA, 2002. Presenza di giallumi della vite in impianti di "Falanghina" nel beneventano e di altri vitigni in Basilicata. *Petria*, **12** (3), 447-448.
- MARTINI M., S. BOTTI, C. MARCONE, C. MARZACHI, P. CASATI, P. A. BIANCO, R. BENEDETTI, A. BERTACCINI, 2002. Genetic variability among Flavescence dorée phytoplasmas from different origins in Italy and France. *Molecular and Cellular Probes*, **16**, 197-208.
- SCHNEIDER B., E. SEEMÜLLER, C. D. SMART, B. C. KIRKPATRICK, 1995. Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas. In: *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmaology* (S. Razin, J. G. Tully, eds), Vol. I, Academic Press, San Diego, USA, 369-380.
- VIGGIANI G., 2002. Il vettore della flavescenza dorata trovato in Basilicata. *L'Informatore Agrario*, **58**, 59.

**MONITORAGGIO DEI VETTORI DEI FITOPLASMI
DELLA VITE IN LOMBARDIA ED EMILIA ROMAGNA
(ITALIA SETTENTRIONALE)**

E. Mazzoni, P. Cravedi, R. Nicoli Aldini, F. Pavesei

Istituto di Entomologia e Patologia Vegetale
Università Cattolica del Sacro Cuore
Via E. Parmense, 84, I-29100 - Piacenza

La presente indagine è stata svolta tra la primavera 2003 e l'estate 2004 in vari vigneti della Lombardia (province di Pavia: Oltrepò pavese; Milano: colli di S. Colombano al Lambro; Mantova: Oltrepò mantovano) e dell'Emilia Romagna (provincia di Piacenza). Sono state ricercate soprattutto le 2 specie chiave: *Scaphoideus titanus* e *Hyalesthes obsoletus*, mediante catture con trappole cromotropiche, sfalci diretti con retino entomologico sulla vite e sulla vegetazione spontanea e campionamenti degli apparati radicali delle infestanti ospiti di *H. obsoletus* nel periodo invernale.

Gli esemplari raccolti sono stati analizzati mediante PCR diretta impiegando principalmente i primers M1-P8 per il legno nero (Marcone *et al.*, 1996; Marzachi *et al.*, 2000) e FAY-REY per la flavescenza dorata (Marzachi *et al.*, 2001).

S. titanus è risultato essere ormai estremamente raro. Pochi esemplari di varie età sono raccolti nei vigneti in provincia di Piacenza, ma non sono mai risultati positivi all'analisi molecolare. Nei vigneti della Lombardia è stata rinvenuta solo una coppia di individui in trappole collocate a S. Colombano al Lambro (Milano). Questi esemplari sono però risultati positivi alla PCR.

H. obsoletus è presente invece in ogni area indagata, ma ci sono però differenze di abbondanza e positività. L'attività della specie è legata essenzialmente all'ortica e ad altre infestanti e assai raramente è stata raccolta direttamente su vite. Le presenze maggiori si sono avute in val Tidone (parte occidentale della provincia di Piacenza direttamente confinante con l'Oltrepò pavese) e in provincia di Mantova. La maggior frequenza di individui positivi alle analisi molecolari si sono però avute in Oltrepò pavese (Pavia) ed in val Tidone (Piacenza).

Parole chiave: *Scaphoideus titanus*, *Hyalesthes obsoletus*, Legno nero, Flavescenza dorata.

Summary

Monitoring of grapevine phytoplasma vectors in Lombardia and Emilia Romagna (northern Italy)

This survey was carried out from spring 2003 to the end of summer 2004 in several vineyards of Lombardia (Oltrepò pavese, S. Colombano al Lambro hills, Oltrepò mantovano) and Emilia Romagna (Piacenza province).

Above all were studied the two key species: *Scaphoideus titanus* and *Hyalesthes obsoletus*.

Chromotropic yellow sticky traps and sweeping net were used for monitoring these hoppers on grape and on weeds. In winter also samplings of root systems of the host weeds hosts of *H. obsoletus* were done.

The specimens collected were analysed by PCR assays using the following primers: M1-P8 to detect “black wood” (Marcone *et al.*, 1996; Marzachi *et al.*, 2000) and FAY-REY to detect golden flavescence (Marzachi *et al.*, 2001).

S. titanus now is extremely rare. A few, different age specimens were collected in vineyards in Piacenza province but none was found to be positive using PCR assay. In Lombardia vineyards only a couple of the leafhopper were captured by chromotropic traps in S. Colombano al Lambro (Milano) but both were “positive” in the PCR assay.

H. obsoletus is widely distributed and was found in all the inspected vineyards but there are some differences if abundance and positivity to PCR assay are considered. This species is clearly linked to *Urtica* and other weeds and only in extremely rare cases it was collected on grape.

The greatest abundance was in val Tidone (western part of the Piacenza province directly bordering on the Oltrepo pavese) and in Mantova province. The highest frequency of “positive” specimens were observed in Oltrepo pavese (Pavia) and in val Tidone (Piacenza).

Key words: *Scaphoideus titanus*, *Hyalesthes obsoletus*, black wood, golden flavescence.

Lavori citati

- MARCONE C., A. RAGOZZINO, B. SCHNEIDER, U. LAUER, C.D. SMART, E. SEEMÜLLER, 1996. Genetic characterization and classification of two phytoplasmas associated with spartium witches'-broom disease. *Plant Disease*, **80**(4), 365-371.
- MARZACHI C., F. VERATRI, M. D'AQUILIO, A. VISCHI, M. CONTI, G. BOCCARDO, 2000. Molecular hybridization and PCR amplification of non-ribosomal DNA to detect and differentiate stolbur phytoplasma isolates from Italy. *Journal of Plant Pathology*, **82** (3), 201-212.

MARZACHI C., S. PALERMO, A. BOARINO, F. VERATRI, M. D'AQUILIO, A. LORIA, G. BOCCARDO, 2001. Optimization of a one-step PCR assay for the diagnosis of Flavescence dorée-related phytoplasmas in field-grown grapevines and vector populations. *Vitis*, **40(4)**, 213-217.

Attività cofinanziata dalla regione Lombardia (Progetto LNHA e AGYV), della Fondazione di Piacenza e Vigevano e dalla Camera di Commercio Industria, Artigianato e Agricoltura di Piacenza.

DIFFUSIONE DEL LEGNO NERO NELLE PRINCIPALI AREE VITICOLE DEL LAZIO

G. Pasquini¹, L. Ferretti^{1,2}, V. Lumia¹, R. Sciarroni^{1,2}

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

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

In Italia i giallumi di origine fitoplasmale che più frequentemente si riscontrano su vite sono rappresentati dalla Flavescenza dorata (FD) e dal Legno nero (LN). Mentre la prima è ancora essenzialmente confinata nelle aree viticole dell'Italia settentrionale, probabilmente a causa delle limitazioni ambientali del suo vettore specifico (*Scaphoideus titanus* Ball.), il Legno nero sembra avere una diffusione più generalizzata potendosi riscontrare, in forma endemica, in tutte le principali aree vitate del Paese.

Agente causale di questa ampelopatia, non distinguibile dal punto di vista sintomatico da FD, è un fitoplasma appartenente al gruppo 16SrXII-(Stolbur group) (Lee *et al.*, 1998). La natura endemica del LN, per lo più dovuta all'assenza di vettori ampelofagi obbligati caratterizzati da elevata efficienza di trasmissione, rende questa malattia meno pericolosa rispetto a FD ma, comunque, in grado di indurre rilevanti danni economici nei vigneti in cui è presente.

La necessità di approfondire le conoscenze sulla epidemiologia di questo patogeno ha stimolato l'avvio di indagini sulla diffusione del LN in aree viticole di alcune regioni dell'Italia centrale e meridionale. Nel presente lavoro si riportano i risultati di sopralluoghi condotti nel Lazio dove le uniche informazioni relative alla presenza di LN nei vigneti locali si riferivano ad una segnalazione in un vigneto in provincia di Roma (Del Serrone *et al.*, 1995).

Sintomi di giallumi sono stati osservati in vigneti situati nelle province di Viterbo, Roma, Latina e Frosinone su piante appartenenti a diverse varietà fra le più rappresentative del panorama varietale del Lazio (Montepulciano, Sangiovese, Cesanese d'Affile, Nero Buono di Cori, Trebbiano toscano, Malvasia, Chardonnay, Bellone, Bombino bianco, Pizzutello). Le manifestazioni sintomatologiche osservate nei vari vigneti sulle diverse varietà non si discostavano da quelle riportate in letteratura, e alcune di esse, in particolare Bellone e Chardonnay, sono risultate particolarmente sensibili all'infezione fitoplasmale, in quanto evidenziavano sempre sintomatologie gravi a carico di tutto l'apparato vegetativo. Dall'indagine è emerso che il 22,7% delle piante provenienti dai vigneti di diverse province (655/2889) presentava sintomatologie ascrivibili a giallumi fitoplasmali.

Nel periodo agosto-ottobre sono stati raccolti 138 campioni sintomatici, rappresentativi delle varietà e delle aree geografiche indagate, che sono stati sottoposti a diagnosi molecolare. L'amplificazione del gene 16SrRNA è stata effettuata con i primers P1/P7 (Deng e Hiruki, 1991; Schneider *et al.*, 1995) seguita da nested-PCR con i primers R16(I)F1/R1 (Lee *et al.*, 1994) e 16R758F/M23Sr (Gibb *et al.*, 1995; Padovan *et al.*, 1995), successivamente è stata effettuata l'analisi del polimorfismo di restrizione (RFLP) dopo digestione degli amplificati con gli enzimi Mse I e Taq I, rispettivamente.

Una percentuale dell'86,2 delle piante sintomatiche (119/138), sottoposte a saggio diagnostico, è risultata positiva alla presenza di fitoplasm. Nessuna differenza è stata osservata in relazione alle varietà prese in esame, risultando l'agente fitoplasmale presente in tutte le cultivars considerate. L'analisi RFLP, infine, ha confermato la sola presenza del fitoplasma appartenente al gruppo 16Sr XII in tutte le aree viticole considerate.

Parole chiave: Legno nero, Diffusione, Lazio.

Summary

Grapevine Yellows distribution in Latium region

In Italy, the most spread phytoplasmas associated to grapevine yellows are Flavescence dorée (FD) and Bois Noir (BN). FD is mainly present in the northern areas according to the geographic distribution of its specific vector (*Scaphoideus titanus* Ball.), whereas BN is endemically distributed in all Italian areas vocated to grapevine cultivation. The causal agent of BN disease is a phytoplasma belonging to the 16SrXII Stolbur group and it is considered less dangerous than FD probably because of the low transmission efficiency of its vectors. However, the economic damages induced by this phytoplasma on grapevine can be remarkable.

In order to improve the epidemiologic knowledge of BN, a survey was performed in Latium region and the distribution of grapevine yellows disease was focused and upgraded.

Yellows grapevine symptoms have been observed in Frosinone, Latina, Roma and Viterbo provinces on different varieties (Montepulciano, Sangiovese, Cesanese d'Affile, Nero Buono di Cori, Trebbiano toscano, Malvasia, Chardonnay, Bellone, Bombino bianco, Pizzutello) widely cultivated in Latium region. Severe symptoms were observed on some varieties (Bellone and Chardonnay) showing a high sensitivity to the disease. A percentage of 22.7 of symptomatic plants was surveyed. A total of 138 symptomatic samples were collected from all varieties and geographical areas and submitted to molecular analysis.

Detection was performed by direct PCR with the universal primers P1/P7 followed by nested-PCR with the primers R16(I)F1/R1 (Lee *et al.*, 1994) and 16R758F/M23Sr (Gibb *et al.*, 1995; Padovan *et al.*, 1995) and RFLP analysis after digestion with Mse I and Taq I restriction enzymes, respectively.

A percentage of 86.2 of collected samples (119/138) resulted positive to the molecular test. All assayed varieties resulted infected and the RFLP analysis of positive samples confirmed that the identified phytoplasma belongs to the 16SrXII Stolbur group.

Key words: Bois noir, Diffusion, Latium region.

Lavori citati

- DEL SERRONE P., C. MINACCI, M. BARBA, 1995. Diffusione del giallume fitoplasmale della vite in impianti laziali. *Rivista di Viticoltura e di Enologia*, **4**, 11-15.
- DENG S., C. HIRUKI, 1991. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and non-culturable mollicutes. *Journal of Microbiological 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. *Phytopathology*, **84**, 449-566.
- 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.
- 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, sunhemp, sesame, soybean and eggplant. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, **102**, 225 - 232.

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

**GRAVI DEPERIMENTI ASSOCIATI AL GIALLUME EUROPEO
DELLE DRUPACEE (EUROPEAN STONE FRUIT YELLOW ESFY)
IN UN IMPIANTO BIOLOGICO NEL LAZIO**

G. Pasquini¹, V. Lumia¹, L. Ferretti^{1,2}

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

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

I giallumi delle drupacee raggruppano una serie di sindromi (accartocciamento clorotico fogliare dell'albicocco -ACLR, leptonecrosi del susino -PLN, giallume del pesco -PY), causate da un unico agente patogeno, il fitoplasma del giallume delle drupacee (ESFY), appartenente al gruppo tassonomico 16SrX (Lee *et al.*, 1998). Tale fitoplasma è stato rinvenuto frequentemente in impianti frutticoli dell'Italia settentrionale (Carraro *et al.*, 2002) e sporadicamente nell'Italia centro-meridionale (Del Serrone *et al.*, 1998; Marcone *et al.*, 2002; Pilotti *et al.*, 1995).

Nell'estate 2004 sono state notate all'interno di un impianto biologico nei pressi di Roma, piante di albicocco (cvs. Aurora, Harcot, Sungiant, Pisana) di 4 anni di età con gravi sintomi a carico dell'apparato fogliare. Accartocciamenti e decolorazioni evidenti progredivano fino alla clorosi ed alla successiva necrosi delle foglie. Sulla stessa pianta erano presenti branche apparentemente sane e branche completamente disseccate. La malattia mostrava una rapida evoluzione nelle piante colpite, che, nel giro di pochi mesi, giungevano a morte. Nello stesso frutteto sono state notate anche piante di susino (cvs. Grossa di Felicio, President, Stanley) con alterazioni appena evidenti a carico del solo apparato fogliare. Complessivamente l'infezione interessava il 34% delle piante di albicocco ed il 9% delle piante di susino.

Allo scopo di valutare la presenza dell'agente eziologico e di verificarne il gruppo tassonomico di appartenenza, sono state campionate 15 piante sintomatiche di albicocco, 6 piante sintomatiche di susino e 4 piante non sintomatiche di entrambe le specie.

Dalle nervature fogliari è stato estratto il DNA totale (Barba *et al.*, 1998) utilizzato successivamente per i saggi molecolari di PCR diretta e "nested" e per le analisi dei profili dei frammenti di restrizione (RFLP).

Le amplificazioni sono state effettuate con la coppia di oligonucleotidi universali P1/P7 seguite dalle coppie universali R16F2/R2, 16R758F/M23Sr e dalla coppia di oligonucleotidi specifica R16(I)F1/R1. I campioni sintomatici analizzati sono risultati tutti positivi in PCR sia con oligonucleotidi universali che specifici, dimostrando la presenza di un fitoplasma appartenente al gruppo 16Sr X in albicocco ed in susino.

I prodotti di amplificazione ottenuti con la coppia di oligonucleotidi R16F2/R2 sono stati digeriti con gli enzimi di restrizione Mse I e Rsa I, mentre quelli ottenuti con la coppia 16R758F/M23Sr sono stati digeriti con gli enzimi di restrizione Taq I e Mse I al fine di caratterizzare i fitoplasmi responsabili dell'infezione. I frammenti di restrizione dei campioni positivi di albicocco e susino hanno mostrato un pattern riconducibile a quello di ESFY (gruppo 16SrXB). Al momento si sta procedendo alla caratterizzazione molecolare di altri isolati interessanti di albicocco e susino mediante PCR ed RFLP.

L'elevata percentuale di infezione osservata in un impianto così giovane può essere dovuta non solo all'utilizzo di materiale di propagazione infetto, ma anche all'allevamento di tipo biologico che viene adottato nell'impianto considerato. Il non impiego di prodotti di sintesi, infatti, non consente un contenimento della *Caco-psylla pruni* Scopoli, efficace vettore del fitoplasma ESFY associato al giallume europeo delle drupacee che, privo di controllo, favorisce la diffusione in campo della malattia.

Parole chiave: Giallume europeo delle drupacee, Lazio, PCR/ RFLP.

Summary

Severe decline associated with European Stone Fruit Yellows (ESFY) in a organic farming orchard in Latium (Italy)

ESFY phytoplasma, belonging to subgroup B of the apple proliferation group (16SrX), is the causal agent of different diseases of stone fruits as: Apricot Chlorotic Leaf Roll (ACLR), Plum Leptoncrosis (PLN) and Peach Yellows (PY) diseases. The presence of ESFY was reported frequently in Northern Italy (Carraro *et al.*, 2002) and sporadically in Central and Southern Italy (Marcone *et al.*, 2002; Del Serrone *et al.*, 1998; Pilotti *et al.*, 1995).

In summer 2004, severe symptoms on leaves of different apricot varieties (cvs Aurora, Harcot, Sungiant, Pisana) up to four-year-old were observed in a organic farming orchard near Rome. Initially, symptoms developed on single branches with a rolling of leaves and decoloration. The disease rapidly progressed in leaf chlorosis and lead to sudden necrosis and dieback during the same season.

In the same orchard some plum plants (cvs. Grossa di Felicio, President, Stanley) showed a general decline and weak symptoms on few leaves. About 34% of apricot plants had symptoms, whereas only 9% of plum plants showed specific symptoms as previously described.

A total of 21 symptomatic samples (15 apricots and 6 plums) and 4 asymptomatic samples were collected in order to evaluate the presence of phytoplasmal agents.

Total DNA was extracted from fresh midribs of leaves (Barba *et al.*, 1998) and amplified in direct and nested PCR. The amplifications were carried out with universal primers P1/P7 and further tested with universal R16F2/R2, 16R758F/M23Sr and specific R16(X) F1/R1 primers, all derived from 16S-23S rDNA region.

All symptomatic samples were positive in PCR, either with universal or specific primers, demonstrating the presence of a phytoplasma belonging to the 16SrX group in apricot and plum infected plants.

Amplified products from nested PCR performed with R16F2/R2 were digested with Mse I and Rsa I restriction enzymes, whereas those obtained from nested PCR with primers 16r758f/M23Sr were digested with Taq I and Mse I enzymes. All infected apricot and plums showed a pattern identical to ESFY (16SrXB group).

More work is in progress to characterize plum and apricot isolates by PCR and RFLP techniques.

The use of infected propagative material and the difficulty to contain *Cacopsylla pruni* Scopoli (the vector agent associated to ESFY), can probably explain the high percentage of infection observed in this young organic farming orchard.

Key words: European stone fruit yellow, Lazio, PCR/ RFLP.

Lavori citati

- BARBA M., G. BOCCARDO, L. CARRAIO, P. DEL SERRONE, P. ERMACORA, G. FIRRAO, L. GIUNCHEDI, N. LOI, M. MALFITANO, C. MARCONE, C. MARZACHI, R. MUSETTI, R. OSLER, S. PALMANO, C. POGGI POLLINI, A. RAGAZZINO, 1998. Confronto di differenti tecniche di diagnosi applicate al rilevamento di fitoplasmi in pomacee. *Notiziario sulla protezione delle piante*, **9**, 263-278.
- CARRARO L., F. FERRINI, P. ERMACORA, N. LOI, 2002. Role of wild Prunus species in the epidemiology of European stone fruit yellows. *Plant Pathology*, **51**, 513-517.
- DEL SERRONE P., E. BIANCHI, A. LIBERATORE, 1998. Outbreak of apricot chlorotic leaf roll in apricot orchard of Latium, Italy. *Phytopathologia mediterranea*, **37**, 133-139.
- 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.
- MARCONE C., I. CAMELE, A. LANZIERI, G.L. RANA, 2002. Individuazione dei fitoplasmi del giallume europeo delle drupacee e della moria del pero in specie arboree da frutto in Calabria e Basilicata. *Petria*, **12**, 423-425.

PILOTTI M., F. FAGGIOLI, F. LAURETTI, M. BARBA, 1995. Severe die-back of plum in Central Italy is associated with MLOs and virus infections. *Acta Horticulturae*, **386**, 126-131.

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

POSSIBILE TRASMISSIONE DI FITOPLASMI 16SrX-B MEDIANTE *EMPOASCA DECEDENS* P. ED *EMPOASCA* SPP. A *PRUNUS DOMESTICA* L. ED A *PRUNUS SALICINA* LINDL

**M. Pastore¹, S. Paltrinieri², M. Petriccione¹,
R. Priore³, A. Bertaccini²**

¹C.R.A. - Istituto Sperimentale per la Frutticoltura,
Via Torrino, 3, I-81100 Caserta

²DiSTA, Patologia Vegetale, Università di Bologna,
V.le Fanin, 42, I-40127 Bologna

³Dipartimento di Entomologia e Zoologia Agraria,
Università di Napoli "Federico II", Via Università, 100,
I-80055 Portici (Napoli)

Nell'ambito di un progetto nazionale, coordinato dall'Istituto Sperimentale per la Frutticoltura, è stata intrapresa una ricerca sul ruolo degli insetti presenti in campi di albicocco e di susino infetti dal fitoplasma del sottogruppo dal fitoplasma del giallume delle drupacee appartenenti al sottogruppo 6srx-b (ESFYy phytoplasma) (Pastore *et al.*, 2002). Esperimenti di trasmissione del patogeno mediante cattura e successivo inserimento di insetti su piante di albicocco sane, mantenute sotto rete a prova di insetti, hanno permesso di ipotizzare che *Empoasca decedens* P. ed *Empoasca* spp. siano vettori di questo fitoplasma responsabile dell'accartocciamento clorotico fogliare in albicocco (Pastore *et al.*, 2004).

Dal 2002 sono in corso esperimenti per studiare la capacità della medesima specie di trasmettere lo stesso fitoplasma ad una altra specie arborea, il susino, che si ammala di leptonecrosi quando è infettato dal fitoplasma del sottogruppo 16srx-b, responsabile anche dell'accartocciamento clorotico fogliare dell'albicocco. Circa 700 esemplari di *Empoasca decedens* sono stati raccolti con trappole adesive "glutor"; 35 esemplari di *Empoasca decedens* vivi sono stati collocati in luglio 2004 su quattro piante di susino cino-giapponese e tre di susino europeo, coperti da rete antiafide. Tredici campioni di acidi nucleici estratti in gruppi contenenti un numero variabile tra 3 e 12 esemplari di *Empoasca* spp. l'uno, raccolti tra maggio e ottobre 2004, sono risultati infetti. Una pianta di susino europeo ed una pianta di susino cino-giapponese sono risultate positive alla presenza di fitoplasmi 16srx-b rispettivamente dopo quattro e cinque mesi dall'inserimento di cinque esemplari di *E. decedens* su ogni pianta coperta da rete anti-afide. Le piante risultate positive all'analisi molecolare risultavano molto danneggiate al risveglio primaverile, mostrando tutti i rami completamente secchi; solo in maggio 2005, dalle gemme della parte basale del tronco e dei rami inferiori sono germogliate nuove foglie. Sono in corso studi per confermare questi risultati ed accertare l'assenza di altri patogeni che potrebbero aver contribuito alla sintomatologia osservata.

Parole chiave: Fitoplasmi, Susino, PCR/RFLP, Trasmissione, Vettori.

Summary

***Empoasca decedens* P. and *empoasca* spp. possible vectors of 16SRX-B phytoplasmas in *Prunus domestica* L. and in *Prunus salicina* Lindl**

In the frame of a national research project, coordinated by Istituto Sperimentale per la Frutticoltura of the Italian Council for Research in Agriculture (C.R.A.), *Empoasca decedens* and *Empoasca* spp. were reported as possible vector of 16SrX-B phytoplasmas in apricot (Pastore *et al.*, 2004).

Since 2002 trials were performed to verify the possibility of these leafhoppers to transmit the same phytoplasmas to European and Japanese plum trees, both sensible to this pathogen.

Thirteen samples of nucleic acids extracted as batches from a variable number of *Empoasca* spp. (from three to twelve), collected between May to October 2004, resulted positive to phytoplasma presence. In the same fields, 35 living insects of the same species were collected in July 2004 and inserted in Japanese and European plum plants maintained under insect-proof nets.

After four and five months from the contact with *Empoasca* one out of the three European and one out of the four Japanese plum trees, respectively, showed in nested PCR/RFLP the presence of 16SrX-B phytoplasmas.

These two plants showed in Spring 2005 drying on all branches and only in May new sprouting was visible from basal buds. Studies are in progress to confirm these results and to verify the presence of other possible agents associated with the disease observed.

Key words: Phytoplasmas, Plum, PCR/RFLP, Transmission, Vectors.

Lavori citati

PASTORE M., S. PALTRINIERI, R. PRIORE, A.M. SIMEONE, E. RAFFONE, M. SANTONASTASO, A. BERTACCINI, 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.

Lavoro svolto nell'ambito del progetto MURST, "Studio sulla interazione molecolare fra fitoplasm, fruttiferi e vettori per individuare resistenze in fruttiferi e per migliorare le tecniche culturali per prevenire le malattie associate a questi patogeni".

STRATEGIE DI CONTROLLO DELLA FLAVESCENZA DORATA DELLA VITE

F. Pavan¹, C. Bellomo¹, L. Carraro¹,
P. Ermacora¹, M. Martini¹, A. Loschi¹, R. Osler¹,
P.A. Bianco², G. Belli², A. Zorloni², P. Casati²,
F. Quaglino², M. Borgo³, E. Angelini³

¹Dipartimento di Biologia Applicata alla Difesa delle Piante,
Università di Udine, Via delle Scienze, 208, I-33100 Udine

²Istituto di Patologia Vegetale, Università di Milano,
Via Celoria, 2, I-20133 Milano

³C.R.A. - Istituto Sperimentale per la Viticoltura,
Viale XXVIII Aprile, 26, I-31015 Conegliano (TV)

Fra i giallumi della vite, la Flavescenza dorata (FD) è quello che attualmente desta in Italia maggiori preoccupazioni. La malattia rappresenta infatti un grave pericolo per la viticoltura ed il vivaismo perché, insieme all'insetto vettore *Scaphoideus titanus* Ball, è in fase di espansione in nuovi territori.

Nell'ambito del progetto finalizzato "I giallumi della vite: un fattore limitante le produzioni vitivinicole", alcune unità operative si occupano di aspetti concernenti la lotta ed il controllo di FD. Più in particolare, gli argomenti delle ricerche sono:

1. Lotta insetticida contro *S. titanus*. Si vogliono confrontare diverse strategie di lotta insetticida (numero di trattamenti all'anno e sostanze attive impiegate) per individuare quelle più efficaci ed economicamente convenienti;
2. Relazione tra entità delle popolazioni di *S. titanus* e andamento della malattia. L'obiettivo di questa ricerca è quello di stabilire in situazioni diverse - es. vigneti con alta o bassa incidenza di FD - la densità del vettore al di sotto della quale non è più vantaggioso effettuare ulteriori interventi insetticidi (Girolami *et al.*, 2002);
3. Il "recovery". La scomparsa di sintomi in viti precedentemente infette da FD e sintomatiche è un fenomeno accertato ma solo in parte chiarito (Osler *et al.*, 2003). Si vogliono acquisire conoscenze sui parametri che regolano il "recovery", le sue basi genetiche e fisiologiche. Si vuole anche stabilire se le viti "recovered" possano costituire possibili sorgenti di infezione, in modo da chiarire l'utilità dell'estirpo.

Parole chiave: Fitoplasma, Recovery, Trattamenti insetticidi, *Scaphoideus titanus*.

Summary

Control strategies against Flavescence dorée

At present, among the grapevine yellows, Flavescence dorée (FD) is responsible for the greatest damage in Italy. The disease, together with the vector *Scaphoideus titanus* Ball is, in fact, in a phase of expansion into new territories.

Some units co-operating in the project "The grapevine yellows: a limiting factor of the viticultural production" are working on aspects concerning the control of FD. In detail, the subjects of the research are:

1. Chemical control of *S. titanus*. The aim of this study is to compare different chemical control strategies (number of applications/year and different insecticides sprayed) in order to determine the most effective and economical ones;
2. Relationship between the population level of *S. titanus* and course of the disease. The objective is to establish, for different situations - e.g. vineyards with high or low incidences of FD - a density of the vector below which further treatments are not worthwhile (Girolami *et al.*, 2002);
3. The recovery phenomenon. The spontaneous remission of symptoms in grapevines that previously had been symptomatically infected by FD phytoplasma is a phenomenon that has been assessed but only in part explained (Osler *et al.*, 2003). The aim of the study is to determine both the parameters regulating recovery and the genetic and physiological bases of the phenomenon. To clarify the usefulness of roguing, another objective is to establish whether recovered grapevines can act as sources of inoculum.

Key words: Phytoplasma, Recovery, Chemical control, *Scaphoideus titanus*.

Lavori citati

- GIROLAMI V., N. MORI, E. BORELLA, C. CAPUZZO, C. SCOPEL, G. POSENATO, 2002. Lotta integrata al vettore della flavescenza dorata. *L'Informatore Agrario*, **58** (24), 10-11.
- OSLER R., L. CARRARO, P. ERMACORA, F. FERRINI, N. LOI, A. LOSCHI, M. MARTINI, P.B. MUTTON, E. REFATTI, 2003. Roguing: a controversial practice to eradicate grape yellows caused by phytoplasmas. *In*: 14th ICVG Conference, Locorotondo (Bari), Italy, 12-17th September 2003, 68.

Lavoro svolto nell'ambito del progetto finalizzato "I giallumi della vite: un fattore limitante le produzioni vitivinicole" finanziato dal Ministero per le Politiche Agricole e Forestali.

Autore di riferimento: Francesco Pavan - e-mail: francesco.pavan@uniud.it

**INDAGINI SULLA PRESENZA DEL GIALLUME EUROPEO
DELLE DRUPACEE (ESFY) E DI ALTRI FITOPLASMI IN PIANTE
SPONTANEE IN PROVINCIA DI TRENTO**

**C. Poggi Pollini¹, L. Giunchedi¹, M. Gobber²,
P. Miorelli², D. Pignatta¹, F. Terlizzi¹**

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

²Istituto Agrario di S. Michele all'Adige,
Centro di Assistenza Tecnica, Via Minch, 1, I-38070 Sarche (TN)

Nella valle del Sarca (TN) il giallume europeo delle drupacee (ESFY= European Stone Fruit Yellow) è endemico nelle coltivazioni di susino europeo e cino-giapponese ed in aumento negli impianti di pesco (Poggi Pollini *et al.*, 2001); su albicocco la malattia ha manifestato una forte recrudescenza negli ultimi due anni, con numerosi casi di “apoplessia”. Durante le stagioni vegetative 2003-2004 sono state così effettuate ricerche più approfondite sul ruolo nel ciclo epidemiologico della malattia di piante spontanee mediante prelievi in cinque località della provincia di Trento (Ceniga, Drò, Massone, Nago, Pratosajano, nella valle del Sarca e Balbido nel Bleggio) vicino a drupacee coltivate con sintomi di ESFY.

Sono state raccolte ed analizzate 291 piante spontanee, di cui 135 drupacee, alcune delle quali indicate in passato come ospiti del fitoplasma (Jarausch *et al.*, 2001); la maggior parte erano asintomatiche, ma alcune presentavano sintomi riferibili a fitoplasmi, tra cui: ingiallimento fogliare (12 piante su 30 di *Celtis australis*), emissione fogliare anticipata rispetto ai fiori e/o scopazzi (8 piante su 70 di *Prunus mahaleb*), rachitismo e scopazzi (3 piante su 6 di *Rhamnus cathartica*), rachitismo (1 pianta su 30 di *Rubus fruticosus*).

L'estrazione del DNA totale e la determinazione immunoenzimatica dei prodotti amplificati (PCR-ELISA) con una sonda specifica per ESFY è stata effettuata come descritto in precedenza (Poggi Pollini *et al.*, 2001). Al fine di evidenziare fitoplasmi di altri gruppi tassonomici sono state inoltre effettuate analisi di nested-PCR sui campioni sintomatici e su 50 asintomatici, utilizzando per la prima amplificazione la coppia di primer universali per i fitoplasmi fP1/rP7 e quindi la coppia di primer fU5/rU3 (universali) o altre specifiche per i gruppi tassonomici 16SrI, III, V e X.

I prodotti amplificati ottenuti con la coppia di primer fU5/rU3 sono stati inoltre digeriti con gli enzimi di restrizione AluI e RsaI ed analizzati in elettroforesi su gel di agarosio.

La presenza di ESFY in *P. mahaleb* con i sintomi descritti è stata valutata anche mediante prove di trasmissione ad indicatori arborei, su semenzali di “G.F. 305, allevati in serra a prova d’insetti.

La tabella 1 mostra i risultati delle analisi molecolari: ESFY è stato rison-

trato solo in drupacee spontanee, anche in elevata percentuale, solo sporadica la presenza del nanismo del rovo (RSP= *Rubus Stunt Phytoplasma*). L'analisi dei profili elettroforetici ha permesso inoltre di individuare nelle piante sintomatiche di *R. cathartica* il fitoplasma degli scopazzi dello spincervino (BWB= Buckthorn Witches'-Broom). I risultati delle prove di trasmissione hanno infine dimostrato come ESFYF possa essere trasmesso, anche se con bassa efficienza, anche da *P. mahaleb*.

Tabella 1 - Risultati delle analisi molecolari.

Specie	N°. campioni positivi/saggiati	Fitoplasma identificato	Località di raccolta campioni positivi
<i>P. mahaleb</i>	8/70 (tutti con sintomi)	ESFYF	Ceniga (4) - Massone (4)
<i>P. spinosa</i>	11/55 (tutti asintomatici)	ESFYF	Ceniga (1) - Massone (10)
<i>R. cathartica</i>	3/6 (tutti con sintomi)	BWBP	Balbido (2) - Massone (1)
<i>R. fruticosus</i>	1/30 (con sintomi)	RSP	Nago

Gli studi effettuati confermerebbero come nella provincia di Trento solo piante spontanee del gen. *Prunus* siano ospiti naturali di ESFYF e mettono ulteriormente in evidenza il pericolo posto da *P. spinosa*, buon ospite sia del fitoplasma che del suo vettore, lo psillide *Cacopsylla pruni* ed in grado di assicurare la sopravvivenza del patogeno anche in assenza di drupacee coltivate (Yvon *et al.*, 2004) nelle aree dove la malattia è endemica, soprattutto se viene riscontrata un'elevata percentuale di piante infette. Il ruolo epidemiologico di *P. mahaleb* è invece ancora dubbio, soprattutto perché tale specie è considerata un cattivo ospite per il vettore (Carraro *et al.*, 2004).

Per quanto riguarda BWBP, si tratta del primo reperimento in Italia di tale fitoplasma, riscontrato solo in Germania ed esclusivamente su piante di *R. cathartica*, con sintomi simili a quelli da noi osservati; BWBP è correlato, dal punto di vista genetico, ai fitoplasmii europei delle piante da frutto (Marcone *et al.*, 2004).

Parole chiave: Giallume europeo delle drupacee, Epidemiologia, *Prunus spinosa*, Scopazzi dello spincervino.

Summary

Detection of European Stone Fruit Yellows (ESFY) and other phytoplasmas in wild plants collected in the Trento area

ESFY is largely distributed in the lower Sarca valley (TN) especially in plum orchards. Recently a severe outbreak with total dieback of several plants, was also observed in apricot trees.

In the two year periods 2003-2004, to obtain more information about ESFY epidemiology, 291 wild plants - 135 wild stone fruit trees - were collected in 5 locations close to ESFY-infected orchards. Most of the plants were asymptomatic; however 12 out of 30 *Celtis australis* plants showed leaf chlorosis, 8 out of 70 *Prunus mahaleb* plants had off-season growth and/or witches'-broom, 3 out of 6 *Rhamnus cathartica* and 1 out of 30 *Rubus fruticosus* bushes showed stunted growth and witches'-broom. Total DNA extraction and ESFY-specific immunoenzymatic detection of PCR products (PCR-ELISA) were performed as previously described (Poggi Pollini *et al.*, 2001). PCR products from all symptomatic plants and also from 50 asymptomatic samples were initially amplified with universal ribosomal primer pair fP1/rP7 and diluted aliquots were used as templates in nested-PCR reactions primed by one of the group-specific primer pairs (I, III, V, X) or by universal primer pair fU5/rU3. The latter amplicons were cut with AluI and RsaI and analyzed with agarose gel electrophoresis.

Graft transmission tests on "GF 305" were also performed from ESFY-infected *P. mahaleb* plants.

Table 1 shows that ESFY was only detected in wild stone fruit trees. Buckthorn Witches'-Broom phytoplasma (BWBP) was identified with RFLP in symptomatic bushes of *R. cathartica*, Rubus Stunt phytoplasma (RSP) was only detected sporadically on *R. fruticosus*. Transmission trials by grafting showed that ESFY can also be transmitted from *P. mahaleb* in low percentages.

Table 1- PCR-ELISA and PCR-RFLP results.

Species	No. infected/ tested samples	Phytoplasmas detected	Locations of infected plants
<i>P. mahaleb</i>	8/70 (all with symptoms)	ESFY	Ceniga (4) - Massone (4)
<i>P. spinosa</i>	11/55 (all asymptomatic)	ESFY	Ceniga (1) - Massone (10)
<i>R. cathartica</i>	3/6 (all with symptoms)	BWBP	Balbido (2) - Massone (1)
<i>R. fruticosus</i>	1/30 (with symptoms)	RSP	Nago

The results obtained showed that in the province of Trento only wild stone fruit trees, especially *P. spinosa* were found as ESFYYP-natural hosts. This species can constitute a threat for new plantations, especially if diseased plants are widely distributed because it can provide a reservoir for ESFYYP even in the absence of *Prunus* orchards (Yvon *et al.*, 2004). In contrast the possible role of *P. mahaleb* in ESFYYP epidemiology has to be confirmed, because this species is considered a poor host for the vector, the psyllid *Cacopsylla pruni* (Carraro *et al.*, 2004).

This is the first report of BWBP detection in *R. cathartica* in Italy, a distinct phytoplasma, closely related to phytoplasmas of the apple proliferation group and associated with a lethal witches'-broom disease of *R. cathartica*. BWBP has been detected only in south-western Germany so far (Marccone *et al.*, 2004).

Key words: European stone fruit yellows, Epidemiology, *Prunus spinosa*, Buckthorn witches'-broom.

Lavori citati

- CARRANO L., F. FERRINI, P. ERNACORA, N. LOI, 2004. Transmission of European Stone Fruit Yellows phytoplasma to *Prunus* species by using vector and graft transmission. *Acta Horticulturae*, **657**, 449-453.
- JARAUSCH W., B. JARAUSCH-WEHRHEIM, J.L. DANET, J.M. BROQUAIRE, F. DOSBA, C. SAILLARD, M. GARNIER, 2001. Detection and identification of European stone fruit yellows phytoplasmas in wild plants in the surroundings of apricot chlorotic leaf roll-affected orchards in southern France. *European Journal of Plant Pathology*, **107**, 209-217.
- MARCONE C., K.S. GIBB, C. STRETEN, B. SCHNEIDER, 2004. 'Candidatus Phytoplasma spartii', 'Candidatus Phytoplasma rhamni' and 'Candidatus Phytoplasma allocasuarinae', respectively associated with spartium witches'-broom, buckthorn witches'-broom and allocasuarina yellows diseases. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **54**, 1025-1029.
- POGGI POLLINI C., R. BISSANI, L. GIUNCHEDI, 2001. Occurrence of European stone fruit yellows phytoplasmas (ESFYYP) infection in peach orchards in Northern-Central Italy. *Journal of Phytopathology*, **149**, 725-730
- YVON M., G. LABONNE, G. THEBAUD, 2004. Survival of European Stone Fruit Yellows phytoplasma outside fruit crop production areas: a case study in Southeastern France. *Acta Horticulturae*, **657**, 477-480.

Lavoro effettuato nell'ambito del Progetto Pluriennale: "Sviluppo di tecnologie finalizzate alla valorizzazione delle produzioni vegetali funzionali"- Resp: Prof. Luciano Giunchedi.
Autore di riferimento: Carlo Poggi Pollini Tel. 051-2096725 - e-mail: giunched@agrsci.unibo.it

**MICROFLORA BATTERICA ENDOFITA IN VITI
AFFETTE DA FLAVESCENZA DORATA (FD)
E SOGGETTE A 'RECOVERY'**

**F. Quaglino¹, P. Casati¹, M. Marzorati², L. Brusetti²,
R. Tedeschi³, D. Daffonchio², A. Alma³, P. A. Bianco¹**

¹Istituto di Patologia Vegetale, Università di Milano,
Via Celoria, 2, I-20133 Milano

²Dipartimento di Scienze e Tecnologie Alimentari e Microbiologiche (DISTAM),
Via Celoria 2, I-20133 Milano

³Di.Va.P.R.A. Entomologia e Zoologia applicate all'Ambiente "Carlo Vidano",
Università di Torino, Via L. da Vinci 44,
I-10095 Grugliasco (TO)

La Flavescenza dorata (FD) della vite è una malattia causata da fitoplasmi appartenenti alla specie '*Candidatus Phytoplasma vitis*' (IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team - Phytoplasma taxonomy group, 2004), trasmessi in natura dalla cicalina *Scaphoideus titanus* Ball. Finora, le uniche misure efficaci per il contenimento di FD sono risultate i trattamenti insetticidi contro il vettore e l'estirpazione delle piante malate. Va però detto che spesso, dove la malattia è presente da anni, sono stati osservati fenomeni di risanamento spontaneo, più conosciuti come 'recovery', su molte varietà di *Vitis vinifera* L. (Belli *et al.*, 1976; Osler *et al.*, 2003). Ad oggi, nonostante la vasta letteratura sull'argomento, i meccanismi alla base di tale fenomeno restano sconosciuti.

Lo scopo del presente lavoro è stato quello di verificare l'ipotesi di una possibile correlazione tra 'recovery' e microrganismi endofiti naturali, attraverso la descrizione della comunità batterica endofita presente in piante di vite (varietà Barbera ed Uva rara) sane, infette da FD e risanate. La prima fase del lavoro ha previsto: I) analisi sintomatologica e raccolta di campioni fogliari di vite nei mesi di luglio, agosto e settembre 2004; II) caratterizzazione molecolare dei fitoplasmi presenti (Lee *et al.*, 1994; 2004). Le analisi hanno rilevato '*Ca. Phytoplasma vitis*' (sottogruppo 16SrV-D) nelle viti sintomatiche colpite da FD, e non in quelle sane e 'risanate'. La seconda fase del lavoro ha previsto l'analisi della comunità microbica endofita attraverso l'uso della tecnica LH-PCR (Length Heterogeneity-PCR) (Suzuki *et al.*, 1998; Ritchie *et al.*, 2000), basata sull'amplificazione genica (PCR) di porzioni del 16S rDNA con primers universali e sulla separazione dei frammenti ottenuti mediante elettroforesi capillare. L'analisi è stata condotta su nervatura (sterilizzata e non) e lamina fogliare (sterilizzata) di vite. I dati ottenuti hanno evidenziato la presenza, all'interno della comunità batterica endofita, di due 'cluster' distinti in funzione dell'epoca di raccolta dei campioni: I) cluster 'luglio-agosto';

II) cluster 'settembre'. Questo dato indicherebbe una variazione della composizione della microflora batterica endofita della vite correlata ai diversi periodi della stagione vegetativa. Sulla base dei dati preliminari, finora ottenuti, non è invece stato possibile rilevare, nelle piante di vite 'risanate', la presenza di specifici profili LH-PCR. Dal confronto dei profili LH-PCR, è comunque possibile rilevare, in tutti i campioni analizzati, la costante presenza di alcuni picchi la cui identificazione molecolare, mediante analisi PCR, DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) e sequenziamento delle bande dei profili DGGE, è attualmente in corso.

Parole chiave: Flavescenza dorata, Vite, Recovery, Endofiti, LH-PCR.

Summary

Endophytic bacterial community in Flavescence dorée (FD) infected and recovered grapevine plants

Flavescence dorée (FD) is a grapevine disease caused by '*Candidatus Phytoplasma vitis*' (IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team - Phytoplasma taxonomy group, 2004), transmitted in field by the leafhopper *Scaphoideus titanus* Ball. Up to now, the unique efficient measures for the FD control are considered chemical treatments against *S. titanus* and eradication of diseased plants. On the other hand, where FD is endemic, the occurrence of FD recovery has been frequently observed in several *Vitis vinifera* L. varieties (Belli *et al.*, 1976; Osler *et al.*, 2003). However, the explanation of this phenomenon is still unknown.

So, the aim of this work is to verify the possible correlation between recovery and endophytic microorganisms by the characterization of the endophytic microbial community present in healthy, FD infected and FD recovered grapevine plants (cultivar Barbera and Uva rara). The first phase of this work was based on: 1) field symptom observation and vine sample collection in July, August and September 2004; 2) molecular characterization of FD associated phytoplasmas (Lee *et al.*, 1994; 2004). The results showed the presence of '*Ca. Phytoplasma vitis*' (subgroup 16SrV-D) in the symptomatic infected plants but not in the healthy and the recovered plants. The second phase of this work was based on the characterization of endophytic microbial community by using LH-PCR (Length Heterogeneity-PCR) (Suzuki *et al.*, 1998; Ritchie *et al.*, 2000), a method based on PCR amplification of 16S rRNA gene by universal primers and on the separation of fluorescent PCR products in a capillary sequencer. The analysis was carried out on veins (sterilized or not sterilized) and on laminae (sterilized) of grapevine samples. The data showed the presence within the endophytic bacterial community of two clusters distinct for seasonal parameter changes: I) cluster 'July-August';

II) cluster 'september'. Furthermore, on the basis of these preliminary data, specific LH-PCR profiles have not been found in recovered plants. Moreover, in all the analyzed samples, there is the presence of common electrophoretic signals which will be characterized by using PCR, DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) and sequencing.

Keywords: Flavescence dorée, Grapevine, Recovery, Endophytic microorganisms, LH-PCR.

Lavori citati

- BELLI G., A. FORTUSINI, R. OSLER, 1976. Proc of 6th Meeting ICVG, Cordoba 1976, 7-13.
- IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team - Phytoplasma taxonomy group, 2004. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **54**, 1243-1255.
- LEE I.-M., D.E. GUNDERSEN-RINDAL, R.W. HAMMOND, R.E. DAVIS, 1994. *Phytopathology*, **84**, 559-566.
- LEE I.-M., M. MARTINI, C. MARCONE, S.F. ZHU, 2004. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **54**, 337-347.
- OSLER R., L. CARRARO, P. ERMACORA, F. FERRINI, N. LOI, A. LOSCHI, M. MARTINI, P.B. MUTTON, E. REFATTI, 2003. Proc of 14th Meeting ICVG, Locorotondo, 68.
- RITCHIE N.J., M.E. SCHUTTER, R.P. DICK, D.D. MYROLD, 2000. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**, 1668-1675.
- SUZUKI M., M.S. RAPPE, S.J. GIOVANNONI, 1998. *Applied and Environmental Microbiology*, **64** (11), 4522-4529.

**VARIABILITA' GENETICA DI FITOPLASMI APPARTENENTI
ALLA SPECIE 'CA. PHYTOPLASMA ULMI' RISCONTRATI
IN UN OLMO (*ULMUS MINOR*) SECOLARE**

F. Quaglino¹, P. Casati¹, T. Eccher², P. A. Bianco¹

¹Istituto di Patologia Vegetale, Università di Milano,
Via Celoria, 2, I-20133 Milano

²Dipartimento di Produzione Vegetale (DIPROVE),
Università di Milano
Via Celoria, 2, I-20133 Milano

Gli 'scopazzi dell'olmo', noti in campo internazionale con il nome di elm witches'-broom, è una malattia causata da fitoplasmi (sottogruppo 16SrV-A) appartenenti alla specie '*Ca. Phytoplasma ulmi*' (Lee *et al.*, 2004; IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team - Phytoplasma Taxonomy Group, 2004). Tale malattia, segnalata per la prima volta da Goidanich nel 1951, è particolarmente diffusa in Italia dove colpisce prevalentemente piante delle specie *Ulmus minor* ed *Ulmus pumila*. Recentemente, inoltre, *Macropsis mendax* è stato indicato come vettore del fitoplasma associato alla malattia (Carraro *et al.*, 2004).

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di individuare i fitoplasmi presenti in un esemplare di olmo (*U. minor*) secolare di particolare interesse storico affetto da 'scopazzi'. Pertanto, sono stati raccolti campioni fogliari sia dalla parte asintomatica della chioma sia da quella sintomatica. L'analisi PCR/RFLP del gene 16S rRNA (Lee *et al.*, 1994) ha riscontrato la presenza di '*Ca. Phytoplasma ulmi*' (sottogruppo 16SrV-A) in tutti i campioni esaminati. In seguito, i fitoplasmi rilevati sono stati caratterizzati attraverso: I) sequenziamento degli ampliconi R16P1A/P7A, rp(V)F1A/rp(V)R1A (Lee *et al.*, 2004) e FD9f3/FD9r2 (Angelini *et al.*, 2001); II) allineamento delle sequenze ottenute con quelle depositate in GenBank (Lee *et al.*, 2004; Martini *et al.*, 2002); III) analisi di alberi filogenetici costruiti mediante l'uso di PAUP 4.0. Sulla base del gene 16S rRNA, i fitoplasmi riscontrati sono risultati tra loro identici e molto simili (99,33%) a EY1 (AY197655), EY626 (AY197657) ed EY627 (AY197658). Anche sulla base dei geni rpl22-rps3, i fitoplasmi riscontrati nell'olmo secolare sono risultati tra loro identici e molto simili (99,91%) a EY1 (AY197675), EY125 (AY197676), EY627 (AY197678) e ULW (AF396949). Sulla base del gene secY, invece, sono state individuate, tra i fitoplasmi da noi rilevati, tre 'varianti geniche': una identica alla sequenza nucleotidica secY del fitoplasma EY626 (AY197691) ed altre due, differenti tra loro, distinte dalle sequenze finora note di '*Ca. Phytoplasma ulmi*'. Dai dati ottenuti si può rilevare che, nell'olmo in esame, coesistono 3 fitoplasmi ('*Ca. Phytoplasma ulmi*') diversi tra loro sulla base della sequenza genica non-ribosomale secY. Inoltre, tali fitoplasmi presentano, sulle sequenze geniche rps3 ed rpl22, mutazioni puntiformi in grado di distinguerli dai

fitoplasmi della specie '*Ca. Phytoplasma ulmi*' finora caratterizzati. Data l'importanza del caso in esame, si ritiene opportuno svolgere ulteriori indagini al fine di chiarire il ruolo dei fitoplasmi riscontrati nell'eziologia degli 'scopazzi' dell'olmo.

Parole chiave: *Ulmus minor*, Fitoplasmi, 16S rDNA, rpl22-rps3, secY, Sequenziamento.

Summary

Genetic variability of phytoplasmas belonging to '*ca. phytoplasma ulmi*' in an ancient historic elm (*ulmus minor*) tree

Elm witches'-broom is a disease caused by phytoplasmas (subgroup 16SrV-A) belonging to '*Ca. Phytoplasma ulmi*' species (Lee *et al.*, 2004; IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team - Phytoplasma Taxonomy Group, 2004). This disease, firstly reported by Goidanich in 1951, is particularly spread in Italy who infects essentially *Ulmus minor* and *Ulmus pumila* species. Furthermore, *Macropsis mendax* has been recently indicated as vector of phytoplasma causing the disease (Carraro *et al.*, 2004).

The aim of this work was to detect the phytoplasmas present in an ancient historic elm (*Ulmus minor*) tree affected by elm witches'-broom. Thus, leaf samples have been collected from symptomatic and asymptomatic elm foliage. PCR/RFLP analysis of gene 16S rRNA (Lee *et al.*, 1994) detected the presence of '*Ca. Phytoplasma ulmi*' (subgroup 16SrV-A) in all the examined samples. Then, the identified phytoplasmas have been characterized by: I) sequencing of PCR products R16P1A/P7A, rp(V)F1A/rp(V)R1A (Lee *et al.*, 2004) and FD9f3/FD9r2 (Angelini *et al.*, 2001); II) alignments of obtained sequences with these previously deposited in GenBank (Lee *et al.*, 2004; Martini *et al.*, 2002); III) phylogenetic analysis performed by using software PAUP 4.0. On the basis of 16S rDNA, the phytoplasmas detected in this work were identical among them and very similar (99,33%) to EY1 (AY197655), EY626 (AY197657) and EY627 (AY197658). Also on the basis of rpl22-rps3 gene sequences, the identified phytoplasmas were identical among them and very similar (99,91%) to EY1 (AY197675), EY125 (AY197676), EY627 (AY197678) and ULW (AF396949). Moreover, on the basis of the secY nucleotidic sequences, three 'gene variants' have been found within the phytoplasmas identified in this work: one sequence identical to secY of phytoplasma EY626 (AY197691) and two sequences, different between them, distinct from '*Ca. Phytoplasma ulmi*' secY sequences known. On the basis of the obtained data, 3 phytoplasmas ('*Ca. Phytoplasma ulmi*'), different at level of non-ribosomal sequence secY, have been identified in the *U. minor* examined plant. Furthermore, the phytoplasmas detected have,

on rps3 and rpl22 gene sequences, single mutations that are not present, at now, in other phytoplasmas belonging to '*Ca. Phytoplasma ulmi*'. Because the importance of this study, several analysis will be performed to clarify the role of the found phytoplasmas in the elm witches'-broom etiology.

Keywords: *Ulmus minor*, Phytoplasmas, 16S rDNA, rpl22-rps3, secY, Sequencing.

Lavori citati

- ANGELINI E., D. CLAIR, M. BORGO, A. BERTACCINI, E. BOUDON-PADIEU, 2001. *Vitis*, **40**, 79-86.
- CARRARO L., F. FERRINI, P. ERMACORA, N. LOI, M. MARTIN, R. OSLER, 2004. *Plant Pathology*, **53**, 90-95.
- GOIDANICH G., 1951. *Informatore Fitopatologico*, **14**, 8.
- IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team - Phytoplasma taxonomy group, 2004. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **54**, 1243-1255.
- LEE I.-M., D.E. GUNDERSEN-RINDAL, R.W. HAMMOND, R.E. DAVIS, 1994. *Phytopathology*, **84**, 559-566.
- LEE I.-M., M. MARTINI, C. MARCONE, S.F. ZHU, 2004. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **54**, 337-347.
- MARTINI M., S. BOTTI, C. MARCONE, C. MARZACHI, P. CASATI, P.A. BIANCO, R. BENEDETTI, A. BERTACCINI, 2002. *Molecular and Cellular Probes*, **16**, 197-208.

PRESENZA DI DIFFERENTI ISOLATI DI 'CA. PHYTOPLASMA SOLANI' ASSOCIATI AL LEGNO NERO (LN) DELLA VITE IN LOMBARDIA, TOSCANA E MARCHE

F. Quaglino, A. Zorloni, P. Casati, P.A. Bianco, G. Belli

Istituto di Patologia Vegetale, Università di Milano,
Via Celoria, 2, I-20133 Milano

Il Legno nero (LN), noto come Bois noir (BN) in Francia e Vergilbungskrankheit (VK) in Germania, è una forma di giallume della vite presente pressochè in tutte le aree viticole europee. LN è causato da un fitoplasma appartenente al gruppo dello Stolbur (sottogruppo 16SrXII-A), attualmente inserito nella specie '*Candidatus Phytoplasma solani*' (IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team - Phytoplasma Taxonomy Group, 2004). Esso viene trasmesso alla vite da *Hyalesthes obsoletus* Signoret (Maixner *et al.*, 1995), un cixiide reperibile sulla vite e più frequentemente su specie erbacee quali *Convolvulus arvensis L.*, *Calystegia sepium L.* e *Urtica dioica L.* (Weber e Maixner, 1998). Segnalazioni sempre più frequenti di fenomeni di espansione di LN sono state riportate in questi ultimi anni in varie aree dell'Italia e dell'Europa (Boudon-Padiou, 2003). Anche in Lombardia LN ha raggiunto livelli preoccupanti sebbene, finora, i dati sulla sua reale incidenza e distribuzione siano scarsi e frammentari.

Si è pertanto ritenuto opportuno avviare indagini con lo scopo di acquisire informazioni relative alla presenza ed alla diffusione di LN nelle zone viticole della Franciacorta (BS), della Valtenesi (BS), dell'Oltrepò pavese (PV), dell'Oltrepò mantovano (MN) e delle colline di San Colombano al Lambro (MI). Inoltre, sono stati esaminati campioni di vite provenienti dalla Toscana e dalle Marche. La caratterizzazione molecolare è stata condotta mediante amplificazione del gene 16S rRNA, effettuata con i primer R16P1/P7 seguiti da R16(I)F1/R1, ed analisi RFLP con l'impiego dell'enzima MseI (Lee *et al.*, 1994). Ulteriori analisi hanno previsto l'amplificazione del gene *tuf*, codificante il fattore di elongazione Tu (EF-Tu), con i primer fTuf1/rTuf1 seguiti da fTufAy/rTufAy (Schneider *et al.*, 1997) e successiva analisi di restrizione (RFLP) con gli enzimi TaqI, HindIII, HinfI, HpaII, RsaI, AluI e Sau3AI (Schneider *et al.*, 1997; Langer e Maixner, 2004). I dati ottenuti indicano che, nei campioni esaminati, sono presenti fitoplasmi appartenenti alla specie '*Ca. Phytoplasma solani*', in particolare del tipo VK-I e VK-II, con la netta prevalenza, in Lombardia, del tipo VK-I (22 viti su 26). Per quanto riguarda la Toscana, in tutti i campioni esaminati è stato individuato VK-II, mentre VK-I è stato riscontrato nel campione marchigiano. Questi dati preliminari indicano la necessità di svolgere ulteriori indagini atte a valutare il ruolo delle specie spontanee (erbacee ed arboree) e di *Hyalesthes obsoletus* nella diffusione di LN nei vigneti lombardi.

Parole chiave: Legno Nero, Vite, Tuf gene, RFLP.

Summary

Different isolates of ‘*Candidatus Phytoplasma solani*’ associated with bois noir (BN) detected in Lombardia, Toscana and Marche regions

Legno nero (LN), named Bois noir (BN) in France and Vergilbungskrankheit (VK) in Germany, is a grapevine yellows disease spread in several countries in Europe. LN is caused by a phytoplasma belonging to Stolbur group (16SrXII-A subgroup), now classified in ‘*Candidatus Phytoplasma solani*’ species (IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team - Phytoplasma Taxonomy Group, 2004). This phytoplasma is transmitted to grapevine by *Hyalesthes obsoletus* Signoret (Maixner *et al.*, 1995), found on grapevine plants and more frequently on several weeds as *Convolvulus arvensis* L., *Calystegia sepium* L. and *Urtica dioica* L. (Weber and Maixner, 1998). Recently, LN outbreaks have been reported in several areas in Italy and Europe (Boudon-Padieu, 2003). Now, LN is spreading also in Lombardia region, even if the lack of information about its incidence and distribution is evident.

Therefore, the research has been conducted with the aim to detect and characterize the phytoplasmas involved in the LN etiology, isolated in vineyards of Franciacorta (BS), Valtenesi (BS), Oltrepò pavese (PV), Oltrepò mantovano (MN) and San Colombano al Lambro (MI). Also, vine samples from Toscana and Marche were included. Molecular characterization was conducted by the amplification of 16S rRNA gene, with the primer pair R16P1/P7 followed by R16(I)F1/R1, and RFLP assay by using the restriction enzyme MseI (Lee *et al.*, 1994). Then, the *tuf* gene, coding the elongation factor Tu (EF-Tu), was amplified by using the primers fTuf1/rTuf1 followed by fTufAy/rTufAy (Schneider *et al.*, 1997). PCR products were tested by RFLP assay by the use of the following enzymes: TaqI, HindIII, HinfI, HpaII, RsaI, AluI and Sau3AI (Schneider *et al.*, 1997; Langer and Maixner, 2004). The obtained data indicate the presence, in the examined samples, of phytoplasmas belonging to ‘*Ca. Phytoplasma solani*’ species (VK-I and VK-II types). VK-I was prevalent in Lombardia (22 grapevines on 26). Moreover, in Toscana only VK-II has been detected, while VK-I was found in the sample of Marche region. Further investigation will be conducted in order to evaluate the role of possible alternative herbaceous and woody hosts and of *H. obsoletus* in the epidemiology of LN in Lombardia vineyards.

Keywords: Bois Noir, Grapevine, Tuf gene, RFLP.

Lavori citati

- BOUDON-PADIEU E., 2003. Proc 14th Meeting of ICVG, Locorotondo, 47-53.
- DAIRE X., D. CLAIR, W. REINERT, E. BOUDON-PADIEU, 1997. *European Journal of Plant Pathology*, **103**, 507-514.
- IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team - Phytoplasma taxonomy group, 2004. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **54**, 1243-1255.
- LANGER M., M. MAIXNER, 2004. *Vitis*, **43**, 191-200.
- LEE I.-M., D.E. GUNDERSEN-RINDAL, R.W. HAMMOND, R.E. DAVIS, 1994. *Phytopathology*, **84**, 559-566.
- MAIXNER M., U. AHRENS, E. SEEMÜLLER, 1995. *European Journal of Plant Pathology*, **101**, 241-250.
- SCHNEIDER B., K.S. GIBB, E. SEEMÜLLER, 1997. *Microbiology*, **143**, 3381-3389.
- WEBER A., M. MAIXNER, 1998. *Journal of Applied Entomology*, **122**, 375-381.

**PROVE DI MULTIPLEX REAL-TIME PCR PER LA
DIAGNOSI DEI FITOPLASMI DEL LEGNO NERO E
DELLA FLAVESCENZA DORATA DELLA VITE**

F. Terlizzi¹, A.R. Babini², C. Ratti¹, R. Credi¹

¹Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali (DiSTA),
Università di Bologna, Viale Fanin, 40, I-40127 Bologna

²Servizio Fitosanitario Regione Emilia-Romagna,
Via di Saliceto, 81, I-40129 Bologna

In Europa, la vite (*Vitis vinifera L.*) risulta suscettibile all'infezione di diversi fitoplasmi. I più diffusi ed economicamente importanti sono quelli associati al legno nero (LN) e alla flavescenza dorata (FD). Tali malattie si manifestano con la medesima sintomatologia e quindi solo l'uso di tecniche diagnostiche molecolari (PCR e RFLP) permette la loro identificazione. Il fitoplasma del LN è stato classificato nel sottogruppo 16SrXII-A (Stolbur), mentre quello della FD nei sottogruppi C e D del gruppo 16SrV (giallume dell'olmo) (Lee *et al.*, 1998; Angelini *et al.*, 2001). La loro trasmissione in natura avviene rispettivamente mediante il cixiide *Hyalesthes obsoletus* Signoret e il cicadellide *Scaphoideus titanus* Ball (Boudon-Padieu, 2003).

I fitoplasmi della vite sono particolarmente difficili da rilevare perché nel floema delle piante ospiti sono presenti in basse concentrazioni e distribuiti in modo settoriale. Per la loro diagnosi, usualmente si utilizza la metodologia nested-PCR. In generale, le tecniche PCR risultano molto sensibili ma, nell'esecuzione di saggi su larga scala, possono presentare varie limitazioni. Sono infatti molto laboriose e, soprattutto nel caso della nested-PCR, il rischio di contaminazioni è molto elevato. Per tutti questi motivi, è stato ritenuto utile sperimentare una metodologia diagnostica alternativa.

Il sistema basato sulla chimica TaqMan è già stato applicato con successo alla diagnosi di patogeni vegetali (Schaad *et al.*, 2002; Bianco *et al.*, 2004). Questa tecnica si basa sulla combinazione di una Taq polimerasi ad attività 5'-3' esonucleasica e di una sonda, marcata alle estremità con due fluorocromi ("quencher" e "reporter"), in grado di legarsi a una zona interna del DNA bersaglio delimitato da una coppia di primer specifici. La reazione viene seguita in tempo reale mediante l'utilizzo di un termociclatore associato a una lettore di fluorescenza. Il vantaggio evidente di questa tecnologia è di lavorare in un sistema chiuso con rischio di contaminazione molto limitato, ridotto lavoro manuale post PCR e un'elevata specificità legata all'uso di sonde di ibridazione specifiche.

Il presente studio riporta i risultati preliminari di prove di diagnosi "multiplex" dei fitoplasmi del LN e della FD, usando la tecnica "real-time PCR" e la chimica TaqMan in un ABI PRISM 7000 SDS. Come zona bersaglio è stata scelta una regione variabile del gene 16S rDNA e in base alle differenze nucleotidiche presenti

fra i due fitoplasmi, sono stati disegnati sonde e primer specifici, utilizzando il software Primer Express 2.0 (Applied Biosystem). Per poterle usare simultaneamente nella reazione, la sonda in grado di rilevare il fitoplasma del LN è stata marcata alla estremità 5' con il fluorocromo FAM, mentre quella specifica per il fitoplasma della FD con il fluorocromo VIC. Entrambe le sonde sono state coniugate con MGB alla estremità 3' (Applied Biosystem). La specificità delle sonde è stata verificata utilizzando DNA di differenti fitoplasmi.

I saggi effettuati hanno dato esiti positivi, permettendo di amplificare simultaneamente un frammento dei due diversi fitoplasmi. La "multiplex real time PCR" risulta essere un'ottima tecnica per la diagnosi dei fitoplasmi della vite, risultando specifica, sensibile, rapida e, soprattutto, ideale per analisi su larga scala.

Parole chiave: Legno nero, Flavescenza dorata, Fitoplasmi, Multiplex real-time PCR, TaqMan.

Summary

A multiplex real-time PCR assay for the detection of grapevine Bois Noir and Flavescence Dorée phytoplasmas

In Europe, grapevine (*Vitis vinifera* L.) is affected by two economically important different phytoplasma-induced diseases: Bois Noir (BN) and Flavescence Dorée (FD). These diseases are symptomatically similar and only molecular analyses (PCR and RFLP) of the conserved 16S rDNA gene allow the identification and differentiation of the associated phytoplasmas. BN phytoplasma is classified in the ribosomal subgroup 16SrXII-A (Stolbur) while FD phytoplasma is placed in the elm yellows group 16SrV, subgroups C and D (Lee *et al.*, 1998; Angelini *et al.*, 2001). These phytoplasmas are transmitted in nature by the cicadid planthopper *Hyalostethus obsoletus* Signoret and the leafhopper *Scaphoideus titanus* Ball, respectively (Boudon-Padieu, 2003).

Detection of BN and FD phytoplasmas is particularly difficult, because they are generally present in low concentrations and unevenly distributed in the grapevine phloem. Diagnosis is usually performed by nested-PCR. PCR-based methods, especially nested-PCR, may have some practical limitations for routine diagnostic use. In particular they are labour-intensive and run the risk of carry-over contamination with possible false positive results. Hence, it should be important to develop a reproducible, sensitive and quicker diagnostic procedure, particularly for wide-scale screening.

The TaqMan assay system has been successfully applied to the detection of plant pathogens (Schaad *et al.*, 2002; Bianco *et al.*, 2004). This technique combines a probe (labelled at each end with a reporter and a quencher dye and which is designed to anneal to a sequence internal to the

PCR primers) with the 5'-3' exonuclease activity of Taq polymerase, using a combined thermal cycler and fluorescence reader. As a result, TaqMan assays are closed-tube and no post PCR manipulations are required.

We report here results of preliminary trials for a simultaneous routine detection of FD and BN phytoplasmas, using real-time PCR and TaqMan chemistry on an ABI PRISM 7000 SDS. Specific probes and primers were designed using Primer Express 2.0 software (Applied Biosystem) and analysing variability among sequences of FD and BN phytoplasmas within a variable region of the 16S rDNA gene. These probes were attached with MGB at their 3' ends. The BN phytoplasma probe was conjugated with the reporter dye FAM at 5' end, while the FD phytoplasma probe was conjugated with the reporter dye VIC (Applied Biosystem). Specificity of our developed primer/probe set was demonstrated by amplification experiments using template DNA of phylogenetic different phytoplasmas. This approach has permitted to amplify simultaneously a fragment of the FD and BN phytoplasmas, promising to be a rapid, highly sensitive and specific method for mass screening of numerous samples.

Key words: Bois noir, Flavescence dorée, Phytoplasmas, Multiplex real-time PCR assay, TaqMan.

Lavori citati

- ANGELINI E., D. CLAIR, M. BORGIO, A. BERTACCINI, E. BOUDON-PADIEU, 2001. Flavescence dorée in France and Italy - Occurrence of closely related phytoplasma isolates and their near relationships to Palatinate grapevine yellows and an alder yellows phytoplasma. *Vitis*, **40**, 79-86.
- BIANCO P.A., P. CASATI, N. MARZILIANO, 2004. Detection of phytoplasmas associated with grapevine Flavescence dorée disease using real-time PCR. *Journal of Plant Pathology*, **86(3)**, 257-261.
- BOUDON-PADIEU E., 2003. The situation of grapevine yellows and current research directions: distribution, diversity, vectors, diffusion and control. 14th ICVG Conference, Locorotondo (Bari), Italy, 12-17th September, 47-53.
- 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 sequence. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **48**, 1153-1169.
- SCHAAD N.W., R.D. FREDERICK, 2002. Real-time PCR and its application for rapid plant disease diagnostics. *Canadian Journal of Plant Pathology*, **24**, 250-258.

Lavoro svolto nell'ambito del Progetto Pluriennale: "Sviluppo di tecnologie finalizzate alla valorizzazione delle produzioni vegetali funzionali".

**DIAGNOSI DEL FITOPLASMA ESFY
(GIALLUME EUROPEO DELLE DRUPACEE) NEGLI
ALBICOCCHI CHE NON MOSTRANO SINTOMI -
INCONGRUENZA TRA LE ANALISI MOLECOLARI
E QUELLE BIOLOGICHE**

J. Salava, J. Polá, M. Bryxiová, J. Svodoba

Division of Plant Medicine, Research Institute of Crop Production,
Drnovská 507, Prague 6, 161 06, Czech Republic

Nel 2002 alcune piante di albicocco, coltivate in un frutteto della Moravia meridionale, sono risultate positive ai saggi molecolari per la presenza del fitoplasma del giallume europeo delle drupacee (European stone fruit yellows, ESFY) nonostante non mostrassero alcuna sintomatologia specifica da fitoplasma.

Per meglio comprendere questa positività, ottenuta nel saggio molecolare, ulteriori campioni di albicocco sono stati sottoposti a saggio molecolare e saggio biologico su specifici indicatori legnosi GF 305 utilizzando l' albicocco cv Luizet come testimone positivo, secondo quanto suggerito nei protocolli EPPO (Anonymous, 1998 e 2001). I saggi su indicatore biologico richiedono più tempo per arrivare ad una diagnosi ma rimangono l'unico sistema per confermare lo stato sanitario di piante asintomatiche.

Il DNA totale è stato estratto a partire da 264 albicocchi asintomatici seguendo il protocollo descritto da Ahrens e Seemüller (1992). Le preparazioni di acido nucleico ottenute sono state analizzate tramite nested-PCR utilizzando la coppia di primer universali R16F1/R0 e R16F2/R2 (Lee *et al.*, 1995). Un amplificato delle dimensioni attese è stato ottenuto da 116 dei campioni analizzati e la digestione del prodotto amplificato con l'enzima di restrizione RsaI ha confermato l'infezione ad opera del fitoplasma ESFY. Anche l'uso della coppia di primers specifici fAT/rPRUS (Lorens *et al.*, 1995) ha consentito di individuare la presenza di ESFY in 39 dei 264 campioni saggiati. I 39 campioni positivi in PCR diretta sono risultati positivi anche in nested PCR.

Sulla base dei risultati ottenuti nei saggi molecolari 40 campioni, appartenenti a diverse cultivar di albicocco, risultati positivi ai test molecolari e 26 risultati negativi, sono stati selezionati per i saggi biologici da effettuare in una serra condizionata.

Il controllo positivo (albicocco Luizet) ha manifestato, entro 3-4 settimane, sintomi tipici che portavano a morte la pianta, come già osservato da altri autori (Pilotti e Barba, 1995). Le piante di GF305 innestate con campioni positivi e negativi non hanno evidenziato, invece, sintomatologie evidenti rendendo necessarie ulteriori indagini per confermare l'infezione di ESFY negli albicocchi asintomatici.

Parole chiave: ESFY, Albicocco, Diagnosi, PCR, Indexaggio biologico.

Summary

Diagnostics of ESFY phytoplasma in symptomless apricot trees-disagreement between molecular and biological assays

In 2002 several apricot trees from an orchard in Southern Moravia were positively tested for ESFY phytoplasma by PCR. The trees never showed symptoms of phytoplasma infection and they were not dying. Therefore we decided to test additional apricot trees from the orchard by PCR and biological indexing, and compare obtained results. Biological indexing on GF 305 along with apricot cv. Luizet is recommended by the EPPO Standards (Anonymous 1998 and 2001) for the detection of ESFY phytoplasma in apricot trees. Testing on woody indicators is time-consuming, but is the only satisfactory way of testing a symptomless plant.

Two hundred and sixty-four symptomless apricot trees from the orchard of Seva-Flora in Valtice were used in this study. Total DNA was isolated from apricot shoots according to the phytoplasma-enrichment protocol published by Ahrens and Seemüller (1992). Nucleic acid preparations were first tested by nested PCR using the universal primer pairs R16F1/R0 and R16F2/R2 (Lee *et al.*, 1995). A product of the expected size was obtained confirming infection by a phytoplasma. The use of specific primers fAT/rPRUS (Lorenz *et al.*, 1995) showed that the phytoplasma infecting the apricot trees is ESFY phytoplasma. This was confirmed by digestion of the product obtained by using the R16F2/R2 primer pair with enzyme RsaI. From 264 trees tested, ESFY phytoplasma was detected in 39 trees by PCR with specific primers and in 116 trees using nested PCR in combination with restriction analysis of PCR products. All the 39 trees positive in direct PCR were proved to be positive by nested PCR.

Based on the molecular data 40 trees of different apricot cultivars positive in the molecular tests and 26 trees negative in the tests were selected for the biological indexing. Biological indexing was carried out on peach GF 305 seedlings in an insect proof greenhouse. Different results were obtained using the biological indexing on GF 305. None of the three indicator plants died at 37 out of 40 apricot trees positive in the molecular tests. One indicator plant died at 2 trees (cvs. Ma_arská and Bergeron) and two indicator plants died only at one tree of cv. Leskora. The reaction of dying GF 305 plants was different from their reaction to the positive control (apricot cv. Luizet). Typical symptoms of ESFY phytoplasma appeared on GF 305 plants grafted with chip-buds from infected cv. Luizet within 3-4 weeks. The leaves became dry (they remained on the plant) and the GF 305 plants died. The same symptoms were observed on GF 305 plants by Pilotti and Barba (1995). On the other hand the GF 305 plants grafted with chip-buds from tested apricot trees died after 2-3 months and their leaves fell down. From 26 trees negative in the PCR test, one GF 305 plant died after grafting with chip-buds from a

tree of cv. Velkopavlovická. There were no differences in the reaction of GF 305 plants to grafting with chip-buds from 37 apricot trees positive and 25 trees negative in the molecular tests.

Further investigations are necessary in order to elucidate the disagreement between results of molecular and biological detection of ESFY phytoplasma in symptomless apricot trees.

Key words: ESFY, Apricot, Diagnostics, PCR, Biological indexing.

Lavori citati

- ANONYMOUS, 1998. EPPO Standards - Phytosanitary procedure - PM 3/57 Phytoplasmas in fruit trees and grapevine. Inspection and test methods, 1-7.
- ANONYMOUS, 2001. EPPO Standards - Schemes for the production of healthy plants for planting - PM 4/30 Certification scheme for almond, apricot, peach and plum. *Bulletin OEPP/EPPO*, **31** (4), 463-478.
- LEE I.-M., A. BERTACCINI, M. VIBIO, D.E. GUNDERSEN-RINDAL, 1995. Detection of multiple phytoplasma in perennial fruit trees with decline symptoms in Italy. *Phytopathology*, **85**, 728-735.
- LORENZ K.H., B. SCHNEIDER, U. AHRENS, E. SEEMÜLLER, 1995. Detection of the apple proliferation and pear decline phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and non-ribosomal DNA. *Phytopathology*, **85**, 771-776.
- PILOTI M., M. BARBA, 1995. Un grave deperimento del susino (Severe die-back of plum in central Italy associated with phytoplasmas and viral infections). *Rivista di Frutticoltura*, **3**, 53-55.

Ringraziamenti

This work was financed by project MZE 0002700603 of the Ministry of Agriculture of the Czech Republic.

Autore di riferimento: Jaroslav Salava - e-mail: salava@vurv.cz

Elenco dei partecipanti / *List of Participants*

- ALMA ALBERTO**
Di.Va.P.R.A. Entomologia e Zoologia applicate all'Ambiente "Carlo Vidano",
Università di Torino
Via L. da Vinci 44,
I-10095 Grugliasco (TO)
Tel. 0116708534
Fax 0116708535
e-mail: alberto.alma@unito.it
- ANGELINI ELISA**
C.R.A. Istituto Sperimentale per la Viticoltura
Viale XXVIII Aprile, 26
I-31015 Conegliano (TV)
Tel. 0438456716
Fax 043864779
e-mail: elisa.angelini@ispervit.it
- BACINI ANNA ROSA**
Serv. Fitosanitario Regione Emilia-Romagna,
Via di Saliceto, 81, I-40129 Bologna
Tel. 0512096739
Fax 0512096237
e-mail: rcredi@agrsci.unibo.it
- BAGNOLI BRUNO**
C.R.A. Istituto Sperimentale per la Zoologia Agraria
Via Lanciola, 12/A, I-50125 Firenze
Tel. 0552492234
e-mail: bruno_bagnoli@isza.it
- BARBA MARINA**
C.R.A. Istituto Sperimentale per la Patologia Vegetale
Via C.G. Bertero, 22, I-00156 Roma
Tel. 06820244
Fax 0682070243
e-mail: m.barba@ispave.it
- BELLI GIUSEPPE**
Istituto Patologia Vegetale Milano
Milano
Tel. 0250316785
e-mail: giuseppe.belli@unimi.it
- BERTACCINI ASSUNTA**
Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali (DiSTA)
Università di Bologna
Viale Fanin, 44, I-40127 Bologna
Tel. 0512096755
Fax 0512096723
e-mail: bertaccini_a@biblio.ub.unibo.it
- BIANCHEDI PIERLUIGI**
Istituto Agrario San Michele all'Adige
Via Mach 1, I-38010 San Michele all'Adige (TN)
- BIANCHI GIAN LUCA**
ERSA - Agenzia Regionale per lo Sviluppo Rurale
Via Sabbatini, 5,
I-33050 Pozzuolo del Friuli (UD)
Tel. 0432529246
Fax 0432529250
e-mail: gianluca.bianchi@ersa.fug.it
- BIANCO PIERO ATTILIO**
Istituto di Patologia Vegetale
Università di Milano,
Via Celoria, 2, I-20133 Milano
Tel. 0250316794
e-mail: piero.bianco@unimi.it
- BONDAVALLI ROBERTO**
Cons. Fitos. Provinciale di Reggio Emilia
Reggio Emilia
Tel. 0522271380
Fax 0522277968
e-mail: bondavalli@fitosanitario.re.it
- BORSELLI STEFANO**
Dipartimento di Biologia Applicata alla Difesa delle Piante
Università di Udine
Via delle Scienze, 208, I-33100 Udine
Tel. 04325585003
Fax 0432558501
- BOSCO DOMENICO**
Di.Va.P.R.A. Entomologia e Zoologia applicate all'Ambiente "Carlo Vidano",
Università di Torino
Via L. da Vinci 44,
I-10095 Grugliasco (TO)
Tel. 0116708675
Fax 0116708535
e-mail: domenico.bosco@unito.it
- BOTTI SIMONA**
Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali (DiSTA)
Università di Bologna
Viale Fanin, 44, I-40127 Bologna
Tel. 0512096755
Fax 0512096723
e-mail: bertaccini_a@biblio.ub.unibo.it
- BRACCINI PIERO**
Rivista
- BULGARELLI DAVIDE**
Dipartimento di Produzione Vegetale (DIPROVE), Università di Milano
Via Celoria, 2, I-20133 Milano
e-mail: bulghi.davide@tin.it

- BULGARI DANIELA
Studenti Universitari
Milano
- CAINELLI CHRISTIAN
Istituto Agrario San Michele all'Adige
Via Mach 1, I-38010 San Michele all'Adige
(TN)
Tel. 0461615372
Fax 0461650956
e-mail: christian.cainelli@iasma.it
- CALVI MARICA
Direzione Generale Agricoltura Regione
Lombardia, Serv. Fitosanitario Regionale
V.le Raimondi, 56,
I-22070 Vertemate con Minoprio (CO)
Tel. 031320520
Fax 031887179
e-mail: marica_calvi@regione.lombardia.it
- CARDONI MARCO
Centro Attività Vivaistiche
Via Tebano, 144, I-4018 Faenza (RA)
Tel. 054647150
Fax 054647189
- CARRAIO LUIGI
Dipartimento di Biologia Applicata alla
Difesa delle Pianta
Università di Udine
Via delle Scienze, 208, I-33100 Udine
Tel. 04325585003
Fax 0432558501
- CASATI PAOLA
Istituto di Patologia Vegetale
Università di Milano,
Via Celoria, 2, I-20133 Milano
Tel. 0250316793
e-mail: paola.casati@unimi.it
- LAVAGNA BENIAMINO
Direzione Generale Agricoltura Regione
Lombardia, Serv. Fitosanitario Regionale
V.le Raimondi, 56,
I-22070 Vertemate con Minoprio (CO)
- CAVALLINI GIANNI
Consorzio Fitosanitario Provinciale
di Modena
Via Andreoli, 13, I-41100 Modena
- CHIESA SERENA
Studente Universitario
Milano
- CICCOTTI ANNA
Istituto Agrario San Michele all'Adige
Via Mach 1, I-38010 San Michele all'Adige
(TN)
e-mail: annamaria.ciccotti@isma.it
- CONTI MAURIZIO
Istituto di Virologia Vegetale, CNR,
Strada delle Cacce, 73, I-10135 Torino
- CREDI RINO
Serv. Fitosanitario Regione Emilia-Romagna,
Via di Saliceto, 81, I-40129 Bologna
Tel. 0512096739
Fax 0512096237
e-mail: reredi@agrsci.unibo.it
- CROCE PAOLO
Studente Universitario
Milano
- DAL MOLIN FEDERICA
Servizio Fitosanitario Regionale Veneto
Viale dell'Agricoltura, 1A,
I-37060 Buttapietra (VR)
Tel. 045867639
Fax 045867639
- DURANTE GIUSEPPE
Studente Universitario
Milano
- ERMACORA PAOLO
Dipartimento di Biologia Applicata alla
Difesa delle Pianta
Università di Udine
Via delle Scienze, 208, I-33100 Udine
Tel. 04325585003
Fax 0432558501
e-mail: paolo.ermacora@uniud.it
- FAORO FRANCO
Istituto di Patologia Vegetale
Università di Milano
Via Celoria, 2, I-20133 Milano
- FERRETTI LUCA
C.R.A. Istituto Sperimentale per la Patologia
Vegetale
Via C.G. Bertero, 22, I-00156 Roma
Tel. 0682070207
Fax 0682070243
e-mail: virologia@ispave.it
- FEVOLA FULVIO
Studente Universitario
Milano
- FILEPPI MARZIA
Studente Universitario
Milano
- FILIPPIN LUISA
C.R.A. Istituto Sperimentale per la Viticoltura
Viale XXVIII Aprile, 26
I-31015 Conegliano (TV)
Tel. 0438456710
Fax 043864779
e-mail: isvbd@libero.it

- FIRRAO GIUSEPPE
Dipartimento di Biologia Applicata alla
Difesa delle Piante
Università di Udine
Via delle Scienze, 208, I-33100 Udine
Tel. 0432558531
Fax 0432558501
e-mail: firrao@uniud.it
- GALETTO LUCIANA
Di.Va.P.R.A. Entomologia e Zoologia
applicata all'Ambiente "Carlo Vidano",
Università di Torino
Via L. da Vinci 44,
I-10095 Grugliasco (TO)
Tel. 0116708675
Fax 0116708535
e-mail: domenico.bosco@unito.it
- GARAU RAIMONDO
Dipartimento di Protezione delle Piante
Sez. di Patologia Vegetale e di Entomologia
Agraria, Università di Sassari
Via E. De Nicola, 1, I-07100, Sassari
Tel. 079229297
Fax 079229316
e-mail: garau@uniss.it
- GRANDO M. STELLA
Istituto Agrario San Michele all'Adige
Via Mach 1, I-38010 San Michele all'Adige
(TN)
- GRASSI FABRIZIO
Studente Universitario
Milano
- GRILLINO PATRIZIA
Serv. Fitosanitario Regione Emilia-Romagna,
Via di Saliceto, 81, I-40129 Bologna
Tel. 0514159225
e-mail: pgrillini@regione.emiliaromagna.it
- GUARINO MICHAELA
Dipartimento di Botanica Generale
Milano
Tel. 0250314818
Fax 0250314774
e-mail: michaela.guarino@unimi.it
- GURIOLI DAVIDE
Istituto Agrario San Michele all'Adige
Via Mach 1, I-38010 San Michele all'Adige
(TN)
- JARAUSCH-WEHRHEIM BARBARA
AIPlanta, RLP AgroScience GmbH
Breitenweg 71, D-67435 Neustadt an
der Weinstrasse, Germany
Tel. +4963216711308
Fax +4963216711313
e-mail: barbara.jarausch@agrosience.rlp.de
- JARAUSCH WOLFGANG
AIPlanta, RLP AgroScience GmbH
Breitenweg 71, D-67435 Neustadt an
der Weinstrasse, Germany
Tel. +4963216711307
Fax +4963216711313
e-mail: wolfgang.jarausch@agrosience.rlp.de
- LA ROSA ROSA
Dipartimento di Scienze e Tecnologie
Fitosanitarie (DISTEF)
Università di Catania
Via S. Sofia, 100, I-95124 Catania
Tel. 0957147354
Fax 0957147264
e-mail: larosa@unict.it
- LEE ING-MING
Molecular Plant Pathology Laboratory
Plant Sciences Institute
USDA, ARS Beltsville, MD 20705 U.S.A.
- LESSIO FEDERICO
Di.Va.P.R.A. Entomologia e Zoologia
applicata all'Ambiente "Carlo Vidano",
Università di Torino
Via L. da Vinci 44,
I-10095 Grugliasco (TO)
Tel. 0116708677
Fax 0116708535
e-mail: federico.lessio@unito.it
- LOI NAZIA
Dipartimento di Biologia Applicata alla
Difesa delle Piante
Università di Udine
Via delle Scienze, 208, I-33100 Udine
Tel. 04325585003
Fax 0432558501
e-mail: nazia.loi@uniud.it
- LOSCHI ALBERTO
Dipartimento di Biologia Applicata alla
Difesa delle Piante
Università di Udine
Via delle Scienze, 208, I-33100 Udine
Tel. 04325585003
Fax 0432558501
e-mail: alberto.loschi@uniud.it
- LUMIA VALENTINA
C.R.A. Istituto Sperimentale per la Patologia
Vegetale
Via C.G. Bertero, 22, I-00156 Roma
Tel. 0682070207
Fax 0682070243
e-mail: virologia@ispave.it

- MARCONE CARMINE
Dipartimento di Biologia, Difesa e
Biotecnologie Agro-Forestali
Università della Basilicata
Viale Ateneo Lucano, 10, I-85100 Potenza
Tel. 0971205519
Fax 0971205503
e-mail: marccone@unibas.it
- MARTINI MARTA
Dipartimento di Biologia Applicata alla
Difesa delle Piante
Università di Udine
Via delle Scienze, 208, I-33100 Udine
Tel. 04325585003
Fax 0432558501
- MARZACHI CRISTINA
Istituto di Virologia Vegetale, CNR,
Strada delle Cacce, 73, I-10135 Torino
Tel. 0113977276
Fax 011343809
e-mail: c.marzachi@ivv.cnr.it
- MATTEDI LUISA
Istituto Agrario San Michele all'Adige
Via Mach 1, I-38010 San Michele all'Adige
(TN)
- MAZZONI EMANUELE
Istituto di Entomologia e Patologia Vegetale
Università Cattolica del Sacro Cuore
Via E. Parmense, 84, I-29100 - Piacenza
Tel. 0523599239
Fax 0523599235
e-mail: emanuele.mazzoni@unicatt.it
- MILANESI LORENZO
Consorzio Fitosanitario Provinciale
di Modena
Via Andreoli, 13, I-41100 Modena
- MONTANI SIMONE
Studente Universitario
Milano
- MORASSUTTI CARLA
ERSA - Agenzia Regionale per lo
Sviluppo Rurale
Via Sabbatini, 5, I-33050 Pozzuolo del Friuli
(UD)
- MORETTI MANOLA
Dipartimento di Biologia Applicata alla
Difesa delle Piante
Università di Udine
Via delle Scienze, 208, I-33100 Udine
Tel. 0432558529
Fax 0432558501
e-mail: manola.moretti@uniud.it
- MORI NICOLA
Area Centro Studi, Via Garibaldi, 5,
I-37057 San Giovanni Lupatoto (VR)
Tel. 3486911951
Fax 045548412
e-mail: nicola.mori@agrea.it
- MOROSSETTI ARIANNA
Studente Universitario
Milano
- MORUZZI SERENA
Dipartimento di Biologia Applicata alla
Difesa delle Piante
Università di Udine
Via delle Scienze, 208, I-33100 Udine
Tel. 04325585003
Fax 0432558501
e-mail: serena.moruzzi@uniud.it
- MOSER MIRKO
Istituto Agrario San Michele all'Adige
Via Mach 1, I-38010 San Michele all'Adige
(TN)
Tel. 004963216711309
e-mail: mirko.moser@agrosocienze.rlp.de
- MUSETTI RITA
Dipartimento di Biologia Applicata alla
Difesa delle Piante
Università di Udine
Via delle Scienze, 208, I-33100 Udine
Tel. 04325585021-03
Fax 0432558501
e-mail: rita.musetti@unidiud.it
- OSLER RUGGERO
Dipartimento di Biologia Applicata alla
Difesa delle Piante
Università di Udine
Via delle Scienze, 208, I-33100 Udine
Tel. 04325585003
Fax 0432558501
- PACIFICO DAVIDE
Istituto di Virologia Vegetale, CNR,
Strada delle Cacce, 73, I-10135 Torino
Tel. 0113977276
Fax 011343809
e-mail: c.marzachi@ivv.cnr.it
- PAJORO MASSIMO
Di.Va.P.R.A. Entomologia e Zoologia
applicata all'Ambiente "Carlo Vidano",
Università di Torino
Via L. da Vinci 44,
I-10095 Grugliasco (TO)
Tel. 0116708535
e-mail: massimo.pajoro@unito.it

- PALTRINIERI SAMANTA**
Serv. Fitosanitario Regione Emilia-Romagna,
Via di Saliceto, 81, I-40129 Bologna
Tel. 0512096755
Fax 0512096723
e-mail: bertaccini_a@biblio.ub.unibo.it
- PANIO GIOSUÈ**
Studente Universitario
Milano
- PASTORE MARIA**
C.R.A. Istituto Sperimentale per
la Frutticoltura
Via Torrino, 3, I-81100 Caserta
Tel. 0823256240
Fax 082325239
e-mail: pastore2000@inwind.it
- PAVAN FRANCESCO**
Dipartimento di Biologia Applicata alla
Difesa delle Piante
Università di Udine
Via delle Scienze, 208, I-33100 Udine
Tel. 04325585003
Fax 0432558501
e-mail: francesco.pavan@uniud.it
- PEDÒ STEFANO**
Dipartimento di Produzione Vegetale
(DIPROVE), Università di Milano
Via Celoria, 2, I-20133 Milano
Tel. 3406858591
Fax 0250316553
e-mail: stefano.pedo@unimi.it
- PINZAUTI FRANCESCA**
C.R.A. Istituto Sperimentale per la
Zoologia Agraria
Via Lanciola, 12/A, I-50125 Firenze
Tel. 0552492258
e-mail: francesca_pinzauti@isza.it
- POGGI POLLINI CARLO**
Serv. Fitosanitario Regione Emilia-Romagna,
Via di Saliceto, 81, I-40129 Bologna
Tel. 0512096725
Fax 0512096237
e-mail: giunched@agrsci.unibo.it
- PRATI STEFANIA**
Istituto di Patologia Vegetale
Università di Milano,
Via Celoria, 2, I-20133 Milano
Tel. 0250316787
e-mail: stefania.prati@unimi.it
- PROTA VANDA**
Dipartimento di Protezione delle Piante
Sez. di Patologia Vegetale e di Entomologia
Agraria, Università di Sassari
Via E. De Nicola, 1, I-07100, Sassari
Tel. 079229297
Fax 079229316
- QUAGLINO FABIO**
Istituto di Patologia Vegetale
Università di Milano,
Via Celoria, 2, I-20133 Milano
- ROCCHI FEDERICO**
Istituto di Patologia Vegetale
Università di Milano,
Via Celoria, 2, I-20133 Milano
Tel. 0250316780
e-mail: federico.rocchi@unimi.it
- ROMANAZZI GIANFRANCO**
Dipartimento di Scienze Ambientali e
delle Produzioni Vegetali
Università Politecnica delle Marche
Via Breccie Bianche, I-60131 Ancona
Tel. 0712204336
Fax 0712204856
e-mail: g.romanazzi@uni
- RONZONI SILVIA**
Studente Universitario
Milano
- ROSONI MARA**
Dipartimento di Produzione Vegetale
(DIPROVE), Università di Milano
Via Celoria, 2, I-20133 Milano
Tel. 0250316558
Fax 0250316553
e-mail: mara.rossoni@unimi.it
- SALAVA JAROSLAV**
Division of Plant Medicine
Research Institute of Crop Production,
Drnovská 507, Prague 6, 161 06
Czech Republic
e-mail: salava@vurv.cz
- SARACCO PAOLO**
Di.Va.P.R.A. Entomologia e Zoologia
applicata all'Ambiente "Carlo Vidano",
Università di Torino
Via L. da Vinci 44,
I-10095 Grugliasco (TO)
Tel. 0116708675
Fax 0116708535
e-mail: domenico.bosco@unito.it

- SCOPEL CRISTINA
Dipartimento TeSaf Patologia Vegetale
Università di Padova
Strada Romea, 16 I-35020 Legnaro
(PD)
Tel. 0498272887
Fax 0498272890
e-mail: cristina.scopel@unipd.it
- SKORIC DYANA
Dipartimento Biologia Facoltà Scienze Naturali
Zagabria
Zagabria Croazia
+38514843851
+3854844001
e-mail: dyana@botanic.hr
- STERN ANDREA
Studente Universitario
Milano
- TALEVI SIMONA
Dipartimento di Scienze Ambientali e
delle Produzioni Vegetali
Università Politecnica delle Marche
Via Breccie Bianche, I-60131 Ancona
Tel. 0718081
- TEDESCHI ROSEMARIE
Di.Va.P.R.A. Entomologia e Zoologia
applicata all'Ambiente "Carlo Vidano",
Università di Torino
Via L. da Vinci 44,
I-10095 Grugliasco (TO)
Tel. 0116708535
e-mail: rosemarie.tedeschi@unito.it
- TERLIZZI FEDERICA
Serv. Fitosanitario Regione Emilia-Romagna,
Via di Saliceto, 81, I-40129 Bologna
Tel. 0512096739
Fax 0512096237
e-mail: rcredi@agrsci.unibo.it
- TONDELLI ALESSANDRO
Dipartimento di Produzione Vegetale
(DIPROVE), Università di Milano
Via Celoria, 2, I-20133 Milano
e-mail: a.tonelli@libero.it
- TRIVELLANE VALERIA
C.R.A. Istituto Sperimentale per la
Zoologia Agraria
Via Lanciola, 12/A, I-50125 Firenze
Tel. 0552492258
e-mail: valeria_trivellone@isza.it
- TURATA RICCARDO
Università di Padova
Strada Romea, 16 I-35020 Legnaro
(PD)
Legnaro
- Tel. 0498272810
e-mail: riccardo.turata@unipd.it
- VAIOLI FEDERICO
Studente Universitario
Milano
- ZORLONI ANNA
Istituto di Patologia Vegetale
Università di Milano,
Via Celoria, 2, I-20133 Milano
Tel. 0250316787
e-mail: anna.zorloni@uni.it

Indice per autori / Workshop Autor's Index

ALBANESE G.	109-117-161	CICCOTTI A.M.	157-169
ALMA A.	15-47-51-113	COULIBALY A.	15
	145-151-205	COULIBALY N'TO	15
ANGELINI E.	77-97-151-155-161-199	CRAVEDI P.	185
BABICI M.	23	CREDI R.	27-73-81-217
BACINI A.R.	27-217	D'ASCENZO D.	173
BAGNOLI B.	55-151	DAFFONCHIO D.	145-205
BALASZ Z.	51	DAL MOLIN F.	19
BANDI C.	145	DE GREGORIO T.	15
BARBA M.	117	DELIC' D.	105
BELLARDI M.G.	31	DEROMEDI M.	39-169
BELLI G.	199-213	DI GIOVANNI R.	173
BELLOMO C.	199	DRADI D.	59
BENNI A.	31	ECCHER T.	209
BERTACCINI A.	19-31-33-59-73	ERMACORA P.	105-199
	121-161-177-197	FAORO F.	99
BERTIGNONO L.	47	FERRETTI L.	109-117-189-193
BIANCHEDI P.L.	157-169	FERRINI F.	23
BIANCHI G.	97	FILIPPI M.	39-169
BIANCO P.A.	145-199-205	FILIPPIN L.	77-97-155-161
	209-213	FIRRAO G.	93
BISOGNIN C.	129	FORNO F.	39-85-169
BONDAVALLI R.	59-73-121-137	FORTE V.	151
BORGO M.	77-97-151-155	GALETTO L.	89
	161-199	GARAU R.	33-177
BORSELLI S.	141	GIUNCHEDI L.	65-85-201
BORTOLOTTI P.	73	GOBBER M.	85-201
BOSCO D.	15-89-133	GOTTI R.	31
BOTTI S.	19-121-137-161-177	GRANDO M.S.	39-69
BRAGAGNA P.	39-169	JARAUSCH W.	43-127-129
BRANZANTI B.M.	81-173	JARAUSCH-WEHRHEIM B.	43
BRUSETTI L.	145-205	KRCZAL G.	43
BRYXIOVA M.	221	LA ROSA R.	109-161
CAINELLI C.	39-69	LAVAGNA B.	165
CALVI M.	165	LEANDRIN L.	77
CAMELE I.	181	LEE I.-M.	11
CARRAIO L.	23-105-199	LENTINI A.	177
CASATI P.	161-199-205-209-213	LESSIO F.	51-151
CASTORO V.	181	LOI N.	23-105
CAVALLINI G.	73	LOSCHI A.	199
CELE M.	165	LUCCHETTA G.	77

LUMIA V.	189-193	RADDADI N.	145
MARCONI C.	181	RATTI C.	85-217
MARTINI M.	105-141-199	ROMANAZZI G.	81-173
MARZACHI C.	15-89-113-133-161	ROPELATO E.	85
MARZORATI M.	145-205	SACCHI L.	145
MATTEDI L.	39-85-169	SALAVA J.	221
MAZIO P.	73	SARACCO P.	133
MAZZOLI E.	185	SAVINO V.	81
MENOZZI I.	59	SCHWIND N.	43
MICHELINI C.	155	SCIARRONI R.	109-189
MILANESI L.	59-73-121-137	SECHI A.	33-177
MIORELLI P.	85-201	SEEMÜLLER E.	127-129
MONTERMINI A.	73	SPICCIARELLI R.	181
MORASSUTTI C.	97	SVOBODA J.	221
MORETTI M.	93	TALEVI S.	81
MORI N.	59-65-121-137	TEDESCHI R.	47-89-113-145-205
MORUZZI S.	105	TERLIZZI F.	27-81-201-217
MOSER M.	127	TESSITORI M.	113
MUROLO S.	81-173	TOLU G.	33-177
MUSETTI R.	141	TRIVELLANE V.	55-151
NARDI S.	81	VALLESI P.	31
NICOLI ALDINI R.	185	VELASCO R.	127
OSLER R.	141-199	VICCHI V.	73
PACIFICO D.	113	VISIGALLI T.	65
PAJORO M.	145	ZORER R.	157
PALERMO S.	145	ZORLONI A.	161-199-213
PALTRINIERI S.	19-33-121-197		
PANATO D.	65		
PASQUINI G.	109-117-161-189-193		
PASTORE M.	197		
PAVAN F.	151-199		
PAVESI F.	185		
PECCERELLA T.	43-129		
PEDRAZZOLI F.	157		
PETRICCIONE M.	197		
PIGNATTA D.	65-85-201		
PINZAUTI F.	55-151		
POGGI POLLINI C.	65-85-201		
POLAK J.	221		
PRIORE R.	197		
PROTA V.A.	33-177		
QUAGLINO F.	145-161-199-205 209-213		