



UNIVERSITÀ DI TORINO

Scuola Universitaria Interfacoltà per le
Biotecnologie
Corso di Laurea in Biotecnologie
curriculum Agrario

Relazione finale

**La tipizzazione molecolare rivela la diversa
origine geografica della Flavescenza dorata
della vite e del suo vettore *Scaphoideus
titanus* Ball**

Relatore:
prof. Domenico Bosco

Candidata:
Cane Nadia

Anno accademico 2010-2011

Sommario

1. Introduzione _____ pag. 3
2. *Scaphoideus titanus*: Diffusione e ciclo biologico _____ pag. 9
3. Trasmissione dei fitoplasmi _____ pag. 11
4. Tipizzazione molecolare delle popolazioni di *S. titanus* _____ pag. 13
5. Tipizzazione molecolare di FD _____ pag. 17
6. Conclusioni _____ pag. 21
7. Bibliografia _____ pag. 23

1) Introduzione

La Flavescenza dorata, FD, è una malattia della vite che fa parte dei cosiddetti “giallumi” (GY= grapevine yellows), ossia del gruppo delle ampelopatie causate da fitoplasmi. È stata osservata per la prima volta nel sud-est della Francia (11) negli anni 50'; successivamente simili sintomatologie sono state osservate in molte altre regioni d'Europa, America settentrionale, Asia minore, Sud Africa e Australia. Attualmente la sua diffusione in Europa è preoccupante, soprattutto nell'Italia settentrionale e in Francia, in cui si registrano costantemente delle epidemie, nonostante il fitoplasma FD sia un organismo da quarantena per la Comunità Europea, ed esistano precise regolamentazioni per il controllo, l'eradicazione e la protezione delle piante madri. Oltre che in questi due Paesi, la malattia è presente anche in Spagna (15), Portogallo, Serbia, Slovenia e Svizzera. E' importante sottolineare che l'areale di presenza della malattia è inferiore a quello del suo vettore, il quale è presente in zone in cui non è ancora stata riscontrata la malattia e nelle quali l'azione di lotta preventiva deve essere particolarmente attenta. (12)

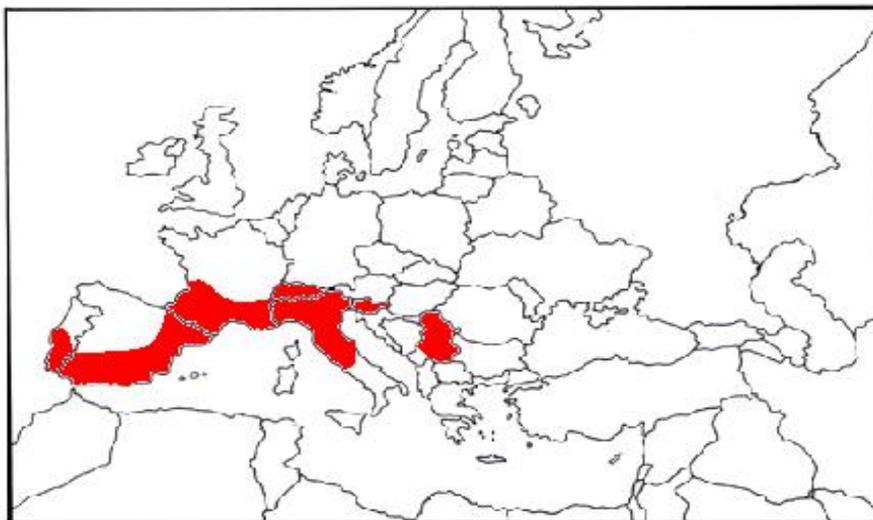


Figura 1: diffusione della FD in Europa.

Questa ampelopatia è causata da *Candidatus Phytoplasma vitis*, fitoplasma appartenente al gruppo genetico del giallume dell'olmo (16SrV), anche se è stata ritenuta per lungo tempo una malattia ad eziologia virale. I fitoplasmi sono organismi procarioti parassiti obbligati

sprovvisti di parete cellulare che si trovano localizzati nel floema della pianta, nel quale possono spostarsi facilmente da un cellula all'altra attraverso i pori delle placche cribrose. In queste cellule inducono aberrazioni anatomiche (depositi di callosio) portanti ad un collasso degli elementi del floema e un consumo eccessivo di metaboliti che causano vari scompensi alla pianta.

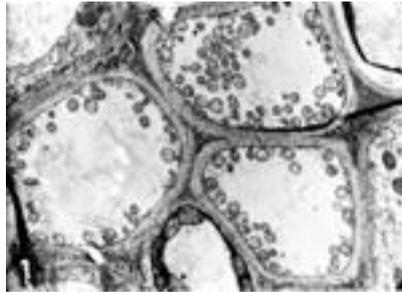


Figura 2: fitoplasmi all'interno di cellule floematiche

Studi recenti hanno inoltre dimostrato che le piante infette da fitoplasmi subiscono una marcata variazione nel contenuto endogeno di sostanze regolatrici della crescita (soprattutto auxine e citochinine) e di metaboliti secondari delle piante come polifenoli e alcaloidi. (12) Queste modificazioni inducono il manifestarsi dei sintomi tipici della FD quali: arrossamenti/ingiallimenti a settori della lamina fogliare, disseccamento delle infiorescenze e grappolini, germogliamento irregolare con germogli deboli e con andamento a zig-zag, accartocciamento fogliare, scarsa lignificazione dei germogli (13).

I fitoplasmi sono stati classificati, fin dai tempi della loro prima scoperta, come appartenenti alla classe dei *Mollicutes*, organismi con cui condividono, oltre al pleomorfismo, anche un genoma di piccole dimensioni (600-1200 kb), portato da un singolo cromosoma con un basso contenuto in GC (20-30%). E' presente anche DNA extracromosomico con struttura simile a quella dei plasmidi batterici. Il recente sequenziamento del genoma di quattro fitoplasmi, ha fornito nuove conoscenze biochimiche e fisiologiche: sembra infatti che questi patogeni manchino di geni prima considerati essenziali per organismi in grado di replicarsi autonomamente, mentre hanno sistema potenziato di trasportatori di substrati specifici dall'ambiente esterno, ricco di nutrienti, verso il loro citoplasma. Probabilmente questo è il risultato di un'evoluzione riduttiva come conseguenza di una vita parassitaria intracellulare

in un ambiente ricco di nutrienti. L'incapacità di coltivare *in vitro* i fitoplasmi rende impossibile applicare a essi i convenzionali criteri di tassonomia. Grazie agli apporti delle tecniche di biologia molecolare si è costruito un sistema di inquadramento tassonomico e filogenetico basato sulle caratteristiche molecolari e genetiche salienti di questi patogeni. Un ruolo fondamentale nella costruzione degli inquadramenti filogenetici e tassonomici dei fitoplasmi ha l'analisi comparativa di sequenze genomiche particolarmente conservate durante l'evoluzione come, ad esempio, quella codificante l'rRNA ribosomale 16S. L'organizzazione complessiva dell'operone rRNA dei fitoplasmi è uguale a quella degli altri procarioti; tuttavia tra le sequenze degli rRNA 16S e 23S, si trova una regione spaziatrice (*spacer region*) di circa 300 nucleotidi, che viene parzialmente trascritta. Dal confronto tra le sequenze 16S di organismi diversi tutti appartenenti alla classe dei Mollicuti e di procarioti tipici, è scaturita l'ipotesi secondo cui i Mollicuti potrebbero derivare da un progenitore ancestrale batterico Gram positivo e clostridio-simile, appartenente alla linea evolutiva dei Lattobacilli, che si suppone abbia perso, nel corso dell'evoluzione, la capacità di sintetizzare la parete cellulare per un fenomeno di degenerazione evolutiva (12). L'analisi RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), condotta sul gene codificante l'rRNA 16S ha consentito di costruire una suddivisione dei fitoplasmi conosciuti in 30 gruppi ribosomali (gruppi 16Sr) e di individuare al loro interno un numero complessivo di circa 100 sottogruppi (9).

SCHEMA RIASSUNTIVO DELLA CLASSIFICAZIONE DEI FITOPLASMI	
Gruppo	Denominazione del ceppo di riferimento
16SrI	Aster yellow
16SrII	Peanut witches'-broom
16SrIII	X- disease
16SrIV	Coconut lethal yellow
16SrV	Elm yellows
16SrVI	Clover proliferation
16SrVII	Ash yellow
16SrVIII	Loofah witches'- broom
16SrIX	Pigeon pea witches'- broom
16SrX	Apple proliferation
16SrXI	Rice yellow dwarf
16SrXII	Stolbur

16SrXIII	Mexican periwinkle virescence
16SrXIV	Bermudagrass white leaf
16SrXV	Hibiscus witches'- broom
16SrXVI	Sugarcane yellow leaf
16SrXVII	Papaya bunchy top
16SrXVIII	American potato purple top wilt
16SrXIX	Japaneses chestnut witches'- broom
16SrXX	Buckthorn witches'- broom
16SrXXI	Pine shoot proliferation
16SrXXII	Nigerian coconut lethal decline
16SrXXIII	Buckland Valley grapevine yellow
16SrXXIV	Sorghum bunchy shoot
16SrXXV	Weeping tea tree witches'- broom
16SrXXVI	Mauritius sugarcane yellows D3T1
16SrXXVII	Mauritius sugarcane yellow D3T2
16SrXXVIII	Havana Derbid phytoplasma
16SrXXIX	Cassia witches'- broom

Il gene 16S a causa della sua bassa variabilità è risultato insufficiente per distinguere più finemente i fitoplasmi. L'analisi di altre sequenze quali quelle codificanti proteine ribosomali (rpS3, rpL22), fattori di allungamento (EF-tu) oltre allo spazio intergenico 16S/23S rRNA sono stati utilizzati come strumento supplementare per distinguere ceppi di fitoplasmi strettamente correlati geneticamente. Occorre inoltre sottolineare che a causa della mancanza di sufficienti caratteristiche fenotipiche per questi patogeni non è prevista la distinzione in genere e specie ma si può parlare di *Candidatus*; si introduce un nuovo "*Candidatus* Phytoplasma" quando esso condivide una omologia inferiore al 97,5% sul gene 16S (1500 nucleotidi) rispetto a fitoplasmi già descritti. È comunque possibile che fitoplasmi che mostrano sul 16S una omologia che supera o eguaglia la soglia sopra citata abbiano caratteristiche molto differenti a livello biologico (vettori), fitopatologico (gamma di ospiti vegetali, sintomatologia indotta) ed ecologico (12).

L'ecosistema vigneto è colonizzato da moltissime specie di insetti possibili vettori di fitoplasmi. La totalità di questi appartengono all'ordine **Hemiptera**, sottordine **Homoptera** e vengono comunemente denominati "cicaline". La famiglia di gran lunga più importante è quella dei Cicadellidi. In generale si tratta di specie fitomize, vale a dire dotate di un caratteristico apparato boccale di tipo pungente-succhiante, e specializzazione trofica che può essere, a seconda dei casi, a carico del floema, dello xilema o del mesofillo fogliare.

Scaphoideus titanus Ball è la cicalina più nota come vettore di FD ed è strettamente monofago della vite in Europa. Altre cicaline vettrici sono polifaghe e si nutrono anche su altre piante arboree e/o erbacee spontanee. Tra esse ritroviamo:

- *Hyalesthes obsoletus* Signoret (Cixiide) vettore del fitoplasma agente causale del Legno nero della vite. In Italia l'ospite principale è *Urtica dioica*, mentre in altri Paesi d'Europa è stato ritrovato più frequentemente su *Convolvulus arvensis*, *Ranunculus bulbosus*, *Calystegia sepium*.
- *Dictyophara europea* L. (Dictyopharidae). Da recenti studi (6), questa cicalina è risultata essere infetta con il fitoplasma della FD. Esperimenti preliminari di trasmissione hanno mostrato che è capace di trasmettere FD da *Clematis vitalba* a vite.
- *Anoplotettix fuscovenosus* (Cicadellidae Deltocephalinae). Gli adulti frequentano latifoglie arboree e arbustive (es: vite) mentre gli stadi giovanili si nutrono su piante erbacee. Studi fatti da Bressan *et al.* 2006, dimostrano che queste cicaline, se iniettate con estratto di fitoplasma della FD, sono in grado di trasmetterlo sia ad un substrato artificiale per l'alimentazione che alle piante, evidenziando il loro possibile coinvolgimento nella diffusione di FD
- *Oncopsis alni* (Cicadellidae Macropsinae), diffuso in tutta Italia, vive a spese dell'ontano (*Alnus* spp.) e può occasionalmente nutrirsi come adulto a spese della vite. In Germania è noto quale vettore del fitoplasma agente del Palatinate grapevine yellows (PGY), strettamente correlato a FD.

Un ottimo vettore, non presente nell'ecosistema viticolo ma molto efficiente nella trasmissione del fitoplasma della FD, è *Euscelidius variegatus*; questa specie è molto usata per studi di trasmissione in laboratorio su piante di *Vicia faba*.

Fin dalla sua scoperta nel Vecchio continente, sono stati fatti numerosi studi per capire le origini del fitoplasma della FD e del suo vettore. I primi studi, emersi intorno al 1980, tendono a dimostrare che sia il fitoplasma che il suo vettore sono di derivazione americana in quanto affermano che il vettore, non manifestando sintomi durante l'infezione, sia coevoluto con il fitoplasma. Fitoplasma e vettore sarebbero quindi originari della stessa regione geografica(11). Visto che era già noto allora che *S. titanus* era indigeno della regione dei grandi laghi dell'America del Nord su diverse specie di *Vitis*, di conseguenza anche il

fitoplasma dovrebbe essere originario di queste zone. Ciò è stato smentito da ulteriori ricerche in questo ambito che verranno analizzati in questo lavoro.

Lo scopo di questa indagine bibliografica è l'analisi dell'origine geografica di FD della vite e del suo vettore mediante studi di tipizzazione molecolare della varie popolazioni. Una migliore comprensione del fenomeno e delle origini di FD può favorire la comprensione dei cicli epidemiologici e di conseguenza la predisposizione di mezzi di lotta e di prevenzione di questa ampelopatia che causa gravissime perdite di produzione. Gli attuali metodi di contenimento, basati su trattamenti insetticidi, eradicazione della piante infette, ecc..., risultano spesso scarsamente efficaci e mai risolutivi.

2) Scaphoideus titanus: diffusione e ciclo biologico

S. titanus appartiene all'ordine **Hemiptera** (Rhynchota), sezione **Auchenorrhyncha**, famiglia **Cicadellidae**, sottofamiglia **Deltocephalinae**. E' una specie di origine nearctica , ove risulta diffusa a macchie di leopardo in una fascia compresa tra il 50° ed il 30° N. La sua prima segnalazione in Europa risale agli anni 50', in Francia, anche se probabilmente la sua presenza nella regione paleartica si può far risalire alla seconda metà del 1800 in corrispondenza delle massicce importazioni di portinnesti americani naturalmente resistenti alla fillossera (10). In Europa questa specie è stata rilevata per la prima volta nel Sud della Francia nel 1960. Attualmente il cicadellide è presente in Croazia, Francia (Corsica inclusa), Portogallo, Serbia, Spagna, Slovenia e Svizzera. In Italia la sua presenza è segnalata in tutto il Nord, oltre che in Toscana, in Umbria, in Campania e Basilicata. Nel suo areale d'origine *S. titanus* è specie polifaga, spesso reperita, oltre che su vite, anche su pesco, melo e molte altre specie arboree quali *Crataegus* spp., *Salix* spp., *Juniperus virginiana*, *Ulmus* spp. e *Fraxinus* spp. In Europa, invece, risulta strettamente monofago su vite, su cui compie una sola generazione nel periodo tardo primaverile-estivo. (12)



Figura 3: Uova di *S. titanus* con in evidenza l'occhio dell'embrione (13)

Sverna come uovo che le femmine depongono tra la fine estate e l'autunno, nel legno della vite di almeno due anni (fig 3). Le uova schiudono con scalarità, a partire dalla metà di maggio fino ai primi di luglio con picco massimo nella prima metà di giugno. Dalla schiusura delle uova si succedono 5 stadi giovanili: 2 di neanidi, non alate, e 3 ninfali, cioè con abbozzi delle ali; come tutti gli insetti, *S. titanus* passa da uno stadio all'altro attraverso la muta, abbandonando il vecchio rivestimento esterno. Ogni stadio ha una durata media di 7 giorni. Pertanto i primi adulti compaiono dopo 35-40 giorni, intorno ai primi di luglio. Le neanidi di 1° e 2° età (1,5 - 2,5 mm) sono inizialmente poco mobili (essenzialmente sedentarie, ma saltano rapidamente se disturbate) e stanno nella vegetazione vicino al tronco, preferibilmente nella parte bassa della pianta o meglio sui polloni e colonizzano la pagina inferiore delle foglie. Il capo di forma triangolare e la presenza di due macchie nere all'estremità dell'addome sono molto caratteristici e permettono la loro distinzione da altre cicaline della vite (fig n° 4). Le ninfe (caratterizzate dalla presenza di abbozzi alari) assumono dimensioni via via crescenti da 3 a 5 mm passando dalla 3° alla 5° età. Anche la colorazione che le caratterizza cambia passando dal bianco traslucido delle neanidi al giallo paglierino nelle ninfe di 4° 5° età, entrambe con macchie ocracee/brune (fig n°5). Gli adulti (fig n° 6), infine, sono di dimensioni variabili (5-6 mm), con le maggiori dimensioni per le femmine e vivono circa un mese e mezzo. In vigneto, a causa della schiusura scalare, si possono trovare fino alla fine di ottobre. Gli adulti sono in grado di volare ma non coprono grandi distanze; anche se con il passare del tempo cresce la mobilità degli insetti e non si può escludere che questi vengano trasportati dal vento anche ad elevate distanze.



Figura 4: Neanide(13)



Figura 5: Ninfa (13)



Figura 6: Adulto (13)

Gli adulti sono i maggiori responsabili della trasmissione della malattia, assieme agli ultimi due stadi giovanili. Questo perché, dal momento dell'acquisizione del fitoplasma alla sua inoculazione, è necessario un periodo di latenza di circa un mese. Un insetto infetto resta tale per tutta la sua vita ma il fitoplasma non passa nelle uova che vengono depositate a fine stagione. Quindi la Flavescenza rinnova la sua minaccia di anno in anno partendo solamente da piante malate: il giovane insetto, che quando nasce è sano, si infetta solamente nutrendosi su di una pianta malata, e successivamente, da adulto, con la nutrizione può trasmettere il fitoplasma ad altre piante. Per questo motivo è indispensabile colpire l'insetto poco prima che possa arrecare danni, ovvero prima che diventi adulto (fig. n° 7) e, nello stesso tempo, è necessario estirpare le piante malate con l'obbiettivo di contenere lo sorgenti di infezione (13).

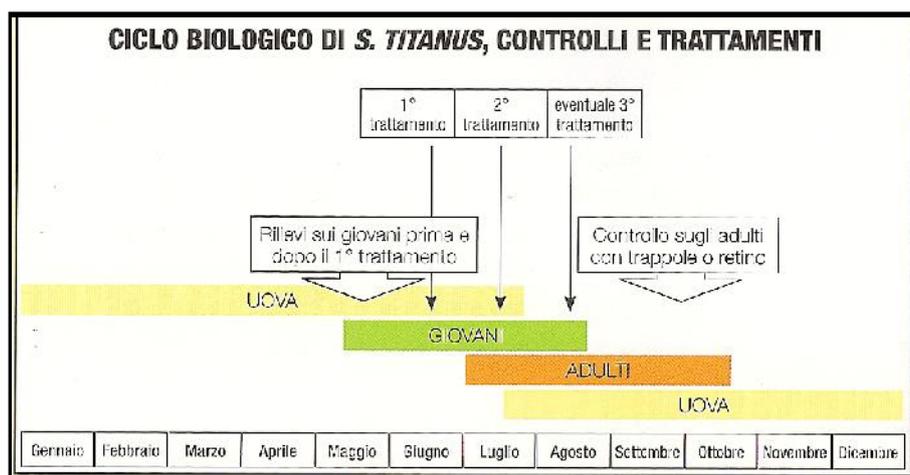


Figura 7: Ciclo biologico dello *Scaphodeus titanus* nell'Italia nord-orientale e strategie di lotta insetticida. Le frecce indicano i periodi ottimali in cui effettuare i trattamenti insetticidi con prodotti neurotossici (13)

3) Trasmissione dei fitoplasm

Il processo di trasmissione dei fitoplasm, mediante insetti vettori con apparato boccale pungente-succhiante, è di tipo persistente- propagativo; ossia dopo l'acquisizione, il

fitoplasma si moltiplica nel corpo dell'insetto (propagativa) e l'insetto resta infettivo per molto tempo (persistente).

La trasmissione può essere divisa in tre fasi (fig 8):

1. **Acquisizione** (AAP acquisition access period): fase iniziale del processo, di durata variabile (ore-giorni), durante la quale gli insetti vettori, mediante suzione del liquido floematico da piante infette, assumono il fitoplasma. L'acquisizione avviene allo stadio giovanile, normalmente a carico delle ninfe di III-IV età.
2. **Incubazione** (LP latent period): periodo che intercorre dal momento in cui il vettore è infetto a quello in cui è infettivo. In questa fase, che per FD dura circa 4 settimane, i fitoplasmi, introdotti attraverso l'attività di nutrizione, attraversano la barriera fisica dell'intestino medio e raggiungono la cavità emocelica, all'interno della quale si moltiplicano attivamente e colonizzano le ghiandole salivari.
3. **Inoculazione** (IAP Inoculation access period): fase conclusiva della trasmissione in cui, attraverso l'introduzione di saliva durante l'attività trofica, gli adulti sono in grado di infettare le piante sane iniettando direttamente nel tessuto cribroso i fitoplasmi.

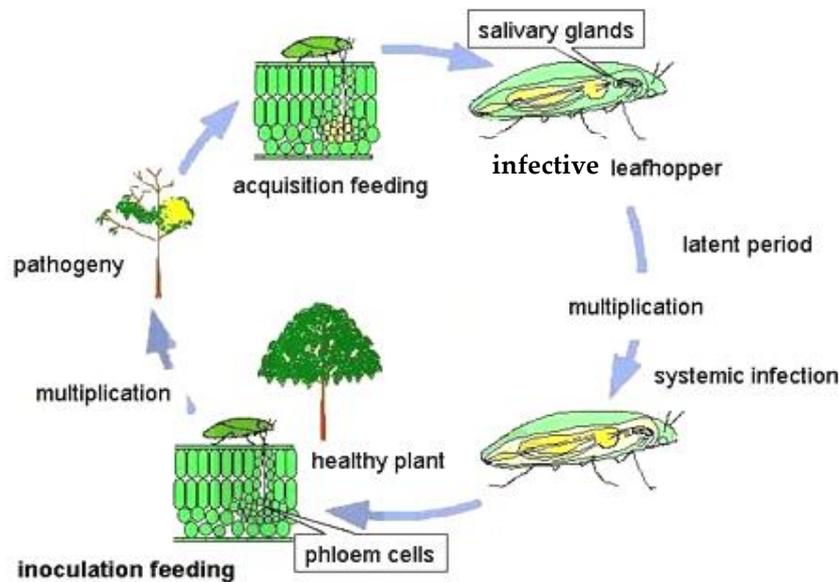


Figura 8: ciclo epidemiologico

Ma un'attenzione importante va riservata alla persistenza della capacità infettiva, la quale è prolungata per l'intera vita dell'insetto. Ciò spiega la velocità con cui si diffonde la FD all'interno e tra i vigneti; è sufficiente che uno *S. titanus* si nutra, allo stadio ninfale, su una

pianta malata per poi trasmettere la malattia a tutte le piante su cui si nutrirà per tutto il resto della sua vita. La dispersione e la mobilità del vettore, sono per ciò componenti importanti nella diffusione e incidenza della malattia (7).

4) Tipizzazione molecolare delle popolazioni di *S. titanus*

Le origini e la diffusione dello *S. titanus* erano ipotizzate da tempo, ma non vi erano evidenze scientifiche a supporto di questa ipotesi.

Come tutti sappiamo, il DNA è la più grande fonte di informazioni e proprio utilizzando marker del DNA, Bertin *et al.* (2006) sono riusciti a dedurre movimenti all'interno e tra le popolazioni di cicaline e a identificare possibili fonti di introduzione della cicalina nel continente Europeo. Per fare questo, sono stati prelevati 283 campioni di *S. titanus* da 16 diverse aree geografiche: 2 in USA, 2 in Francia, 6 in Italia, 2 in Svizzera, 3 in Slovenia e 1 in Spagna. Il DNA di 283 individui è stato sottoposto ad analisi RAPD e i dati ottenuti sono stati accuratamente analizzati. Sotto l'ipotesi che la variazione nei pattern di bande rappresentano la segregazione allelica di loci dominanti, ogni locus è stato trattato come un sistema a 2 alleli corrispondenti alla presenza/assenza della banda amplificata. Ad ogni cicalina è stato assegnato per ogni locus 1 (presenza) o 0 (assenza) in tutti i loci polimorfici per costruire una matrice binaria. I dati di presenza/assenza sono stati usati per ottenere stime sulla relazione genetica tra coppie di individui: "Dissimilarity index (D)" e "Similarity estimator (SM)" che sono basati rispettivamente su dati fenotipici e su frequenza allelica stimata. Il livello di eterogeneità all'interno delle popolazioni è stato osservato per tutti i campioni e la correlazione negativa degli indici D e SM, testa un alto livello di variabilità. Dai dati viene subito messo in evidenza che le popolazioni americane sono molto più polimorfiche delle popolazioni europee. Inoltre è stata riscontrata una varianza genica, all'interno della popolazione americana, del 12,77% (varianza tra popolazioni europee: 1,86%) e un alto valore di distanza genetica è stato verificato in tutte le comparazioni tra le 2 popolazioni americane.

Tabella 1: Misura delle distanze genetiche tra le 16 popolazioni di *S. titanus* (7)

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
USA	Valois	1															
	Geneva Ontario	2	0.096														
France	Moroges	3	0.132	0.125													
	Ponteves	4	0.143	0.134	0.092												
Italy	Chaillon	5	0.140	0.127	0.095	0.073											
	Chambave	6	0.128	0.100	0.111	0.115	0.095										
	San Colombano	7	0.126	0.135	0.085	0.102	0.082	0.100									
	Corniglia	8	0.123	0.115	0.083	0.075	0.068	0.099	0.068								
	Vignale	9	0.137	0.127	0.077	0.084	0.076	0.099	0.086	0.063							
	Treiso	10	0.122	0.130	0.114	0.080	0.074	0.109	0.100	0.086	0.084						
Switzerland	Piano Magadino	11	0.129	0.128	0.109	0.069	0.066	0.085	0.086	0.079	0.071	0.077					
	Castelrotto	12	0.129	0.127	0.112	0.129	0.116	0.076	0.134	0.135	0.105	0.130	0.096				
Slovenia	Goriska Brda	13	0.124	0.123	0.102	0.072	0.058	0.089	0.073	0.071	0.078	0.065	0.059	0.106			
	Izola	14	0.122	0.110	0.110	0.096	0.081	0.077	0.100	0.097	0.097	0.101	0.078	0.089	0.085		
	Nova Gorica	15	0.110	0.129	0.115	0.092	0.086	0.106	0.093	0.083	0.094	0.055	0.073	0.109	0.066	0.092	
Spain	Penedes	16	0.142	0.137	0.075	0.104	0.085	0.120	0.068	0.082	0.089	0.097	0.100	0.101	0.074	0.114	0.101

L'uso dei RAPD ha permesso di dedurre la variabilità e la struttura delle popolazioni di *S. titanus*, in quanto il grado di polimorfismo rilevato da questi marker è vasto (più del 85% dei frammenti segnati per popolazione sono polimorfici).

In accordo con le origini Neartiche della specie, le due popolazioni Americane analizzate in questo studio risultano chiaramente differenziate dalle popolazioni Europee e possiedono alleli peculiari e il più alto livello di variabilità genetica intra-popolazione. L'ampio serbatoio di variabilità genetica nelle popolazioni di cicaline native può costituire il background del processo adattativo durante la colonizzazione.

A seguito della sua introduzione in Europa probabilmente attraverso piantine infette inizialmente arrivate nel sud- ovest della Francia, è stato interessante cercare di capire come si è diffusa. Vista la scarsa capacità di spostamento attivo e il comportamento riproduttivo univoltino, le cicaline possono colonizzare con i propri mezzi solo i vigneti vicini, facendo supporre che la struttura della popolazione rifletta la distanza geografica e/o la cronologia dalla prima entrata in Europa. Al contrario, i dati delle analisi RAPD mostrano la quasi totale mancanza di isolamento in base alla distanza dalla Francia (probabilmente primo Paese europeo colonizzato) alla Spagna e Slovenia (recente colonizzazione), riflettendo una frammentazione genetica complessa tra le popolazioni. Sembra probabile che tale distribuzione della diversità genetica derivi da uno o pochi eventi di introduzione indipendente di *S. titanus* all'interno e tra le differenti aree Europee; la sua diffusione in Europa, invece, è passiva, ed è avvenuta per l'attività dell'uomo che ha trasportato materiale vivaistico che conteneva uova del cicadellide.

Un altro studio sulla struttura genetica delle popolazioni di *S. titanus* è stato condotto da Papura *et al.* (2009). I ricercatori hanno raccolto esemplari di *S. titanus* (N=746) da 24 vigneti nel sud della Francia tra il 2004 e il 2006. Gli esemplari raccolti nello stesso periodo e nello stesso vigneto sono stati considerati come una singola "popolazione". Dieci delle 24 popolazioni sono state campionate in appezzamenti dichiarati affetti da FD dal servizio regionale protezione piante (SRPV). Il DNA totale è stato estratto da ogni cicalina raccolta usando il metodo salting-out. Un sottocampione di 621 su 746 *S. titanus* testati per l'infezione da FD, sono stati genotipizzati per 7 loci microsatelliti (Sti6, Sti15, Sti34, Sti36, Sti38, Sti46 e Sti80). La frequenza allelica e l'eterozigotità è stata calcolata per ogni campione. La struttura genetica dedotta dall'esame dei loci microsatelliti, è stata valutata mediante il calcolo delle distanze geniche tra le popolazioni. Il risultato della distanza genica era diverso da zero, con una range di valori da 0 (popolazioni distanti 2.9 km) a 0,111 (popolazioni distanti 124 Km). Questi valori sono lievemente, ma significativamente, correlati con la distanza geografica tra i siti campione quando tutti i 7 loci microsatelliti erano usati per l'analisi mentre non è stata trovata una correlazione quando 2 loci (Sti36 e Sti38; i quali presentavano un deficit di eterozigoti e inducevano una deviazione dall'equilibrio di Hardy-Weinberg) venivano eliminati dall'analisi. Il risultato di questo studio è proprio l'assenza di una correlazione significativa tra la distanza genetica e quella geografica che si è ipotizzato essere dovuta ad una riduzione delle popolazioni a seguito dei ripetuti trattamenti insetticidi all'interno dei vigneti. Tuttavia, anche eliminando dall'analisi le popolazioni controllate con insetticidi, non è stato trovato isolamento indotto dalla distanza geografica.

Nonostante il metodo utilizzato per la genotipizzazione fosse differente, anche in questo caso è stata evidenziata una debole differenziazione genetica tra le popolazioni di *S. titanus*. Da questi risultati, si potrebbe ipotizzare che ci sia stata una sola o poche introduzioni della cicalina in Europa, le quali si sono moltiplicate e diffuse attivamente e passivamente mediante trasporto umano di materiale d'impianto infetto (portinnesti, barbatelle,..).

Un sostegno ancora più grosso a questa ipotesi è stato dato dalla valutazione della attività delle cicaline sane rispetto a quelle infette. E' stato osservato che, indipendentemente dalla tipologia, l' invasione e la moltiplicazione del fitoplasma riducono sia la vita che la fecondità del vettore limitando il gradiente di diffusione potenziale e la sua fitness (14). Come

conseguenza di ciò, una diffusione spontanea del vettore su grandi distanze è abbastanza improbabile.

In conclusione, da questi studi si evince che la cicalina *S. titanus* è originaria del Nuovo continente ed è stata trasportata, all'interno di materiale infetto sotto forma di uova sotto la corteccia del fusto delle piante di vite, nel sud-ovest della Francia. Da qui è stata diffusa in varie aree d'Europa grazie all'attività passiva dell'uomo ed è arrivata a colonizzare molti areali viticoli ad eccezione di quelli posti più a Sud, dove *S. titanus* non può riprodursi perché le sue uova necessitano di un periodo di freddo per avviare lo sviluppo embrionale.

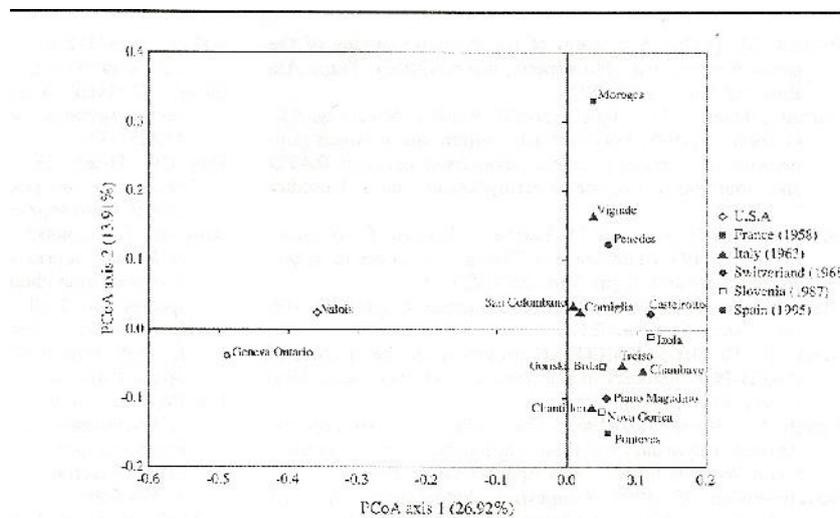


Figura 9: PCoA di 16 popolazioni di *S. titanus* basata sui dati dell'analisi RAPD. Il primo e il secondo asse indicano il 26,92 e il 13,91% della varianza totale, rispettivamente. Gli anni di ritrovamento delle cicaline nei differenti paesi è riportata nella legenda, in parentesi. (7)

5) Tipizzazione molecolare di FD

FD è stata per lungo tempo ritenuta una malattia a eziologia virale come, del resto, altre fitoplasmosi. A partire dal 1972, allorché Caudwell e colleghi dimostrarono che FD è una malattia causata da fitoplasmi, successivamente identificati come appartenenti al gruppo tassonomico 16SrV e, più precisamente, a due sottogruppi indicati come 16SrV-C (a cui appartengono FD70, FD-C, FD2000 e FD-Lomb/Pier) (9) e 16SrV-D (a cui appartengono FD-D, FD88 e FD92) (9) entrambi riuniti sotto la candidata specie *Phytoplasma vitis*.

La diversità genomica in questo gruppo di fitoplasmi è stata esaminata da diversi ricercatori. Nel 1999, Martin *et al.*, mediante analisi di sequenza e RFLP del gene del rRNA che codifica per la subunità 16S e dello spacer intergenico 16S-23S, hanno caratterizzato due differenti isolati di FD. Analizzando la variabilità di due loci genici non ribosomali, *secY* e *rpsC*, Angelini *et al.* 2001, 2003, ipotizzarono che le varianti di FD rilevate in Francia e in Italia appartenessero a tre differenti cluster che sembravano strettamente correlati ai fitoplasmi che infettano l'ontano Europeo o le viti nello stato federale tedesco della Renania-Palatinato. Per documentare ulteriormente la diversità genetica di FD e valutare la relazione genetica con altri fitoplasmi del gruppo 16SrV in Europa, la variabilità di due nuovi loci genici (*map* e *degV*) caratteristici di FD è stata studiata da autori francesi (Arnaud *et al.* 2006) mediante "multilocus sequence typing". In questo studio, sono stati prelevati dei campioni da piante di vite che manifestavano sintomi tipici di FD in vigneti francesi, tedeschi e italiani. Inoltre sono stati raccolti campioni di fitoplasmi da olmi e ontani infetti, rovi con una crescita stentata e da cespugli di ginestra in Francia e in Italia. Gli isolati dei fitoplasmi di riferimento (tabella 2) sono stati precedentemente trasmessi su *Catharanthus roseus* e mantenuti su quest'ospite mediante innesto. L'isolato FD92 è invece propagato su *Vicia faba* mediante trasmissione con il vettore *Euscelidius variegatus*.

Tab 2: Fitoplasmi di riferimento propagati su ospiti erbacei (1)

Strain	Disease	Original host-exptl host	Geographic origin (yr)
EY1	Elm yellows	<i>Ulmus americana-Catharanthus roseus</i>	New York State
UI.W	Elm yellows	<i>Ulmus carpinifolia-C. roseus</i>	France
FD70	Flavescence dorée	<i>Scaphoideus titanus</i> captured on <i>Vitis vinifera-C. roseus</i>	Landes, France (1970)
FD92	Flavescence dorée	<i>S. titanus</i> captured on <i>V. vinifera-Euscelidius variegatus</i> and <i>Vicia faba</i>	Landes, France (1992)
RuS	Rubus stunt	<i>Rubus fruticosus-C. roseus</i>	Southern Italy
ALY	Alder yellows	<i>Alnus glutinosa-C. roseus</i>	Basilicata, Italy
EY17-49	PGY, ^a A type	<i>V. vinifera-C. roseus</i>	Rheinland-Pfalz, Germany
EY38	PGY, C type	<i>V. vinifera-C. roseus</i>	Rheinland-Pfalz, Germany
HDI	Hemp dogbane	<i>Apocynum cannabinum</i>	New York State

^a Palatinate grapevine yellows.

I nuovi loci genici sono stati isolati mediante subtractive suppression ibridation (SSH) e caratterizzati attraverso il genome walking. La libreria SSH è stata realizzata estraendo il DNA da pervinche sane e da pervinche infettate con FD70, in seguito digerito con l'endonucleasi RsaI in modo da costituire un DNA controllo e un DNA tester, rispettivamente. Il tester è stato ligato, in due reazioni separate, con l'adattatore 1 e con il 2R. Ogni prodotto di ligazione è stato denaturato e ibridato con un eccesso di DNA controllo. I due miscugli di ibridazione sono stati mixati insieme in presenza di DNA controllo denaturato. Gli ibridi con entrambi gli adattatori 1 e 2R sono stati amplificati con nested PCR e i prodotti di PCR sono stati incorporati della digossigenina-11-dUTP (per lo screenig) e clonati nel plasmide pGEMt-easy. Mediante genome walking è stato possibile rilevare la presenza di nuovi loci genici utilizzabili nella tipizzazione molecolare di FD: *map*, *secY* e *uvrB-degV*. A seguito del loro sequenziamento, è stato possibile costruire dei primer specifici per la loro amplificazione.

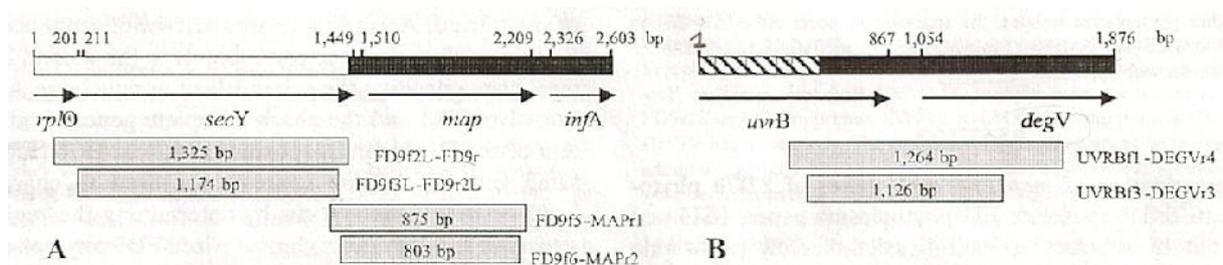


Figura 10: Organizzazione genetica dei loci genici *secY-map* (A) e *uvrB-degV* (B) nel fitoplasma FD70 che causa FD nella vite e la rappresentazione schematica dei prodotti di PCR (rettangoli grigi). Le aree bianche e rigate indicano sequenze precedentemente caratterizzate o mediante SSH, rispettivamente. Le aree nere rappresentano le sequenze determinate attraverso genome walking. (1)

Il campioni di piante ospiti da analizzare sono stati sottoposti a nested PCR con i primer appositamente disegnati e i prodotti di amplificazione sono stati sequenziati. La diversità degli isolati FD è stata valutata determinando la variabilità dei loci genici. Da questa valutazione su campioni di vite è emersa la distinzione di tre gruppi di fitoplasmi responsabili della FD:

- **FD1:** presenta una bassa variabilità genetica ed è geneticamente correlato al ceppo di riferimento FD70 isolato nel sud-ovest della Francia nel 1970. Ha un'incidenza del 17% sui campioni francesi analizzati nello studio ed è diffuso in modo ristretto al sud-ovest della Francia e anche in Italia ma solo nei campioni provenienti da Piemonte e Lombardia
- **FD2 :** non presentano variabilità genetica e sono i più diffusi; sono stati rilevati nel 83% nei campioni analizzati in Francia e in metà dei campioni italiani. Sono correlati geneticamente con il ceppo di riferimento FD92, isolato nel sud-ovest della Francia nel 1992.
- **FD3 :** presenta una grande variabilità genetica ma è stato rilevato solo in Italia, particolarmente nel nord-est. Sono correlati con il ceppo di riferimento FD-C.

Tutti e 3 i cluster sono diffusi da *S. titanus*. Studi sulla struttura della popolazione di *S. titanus* in relazione alla tipologia di FD, non hanno evidenziato alcuna correlazione(5). La diversa diffusione dei vari ceppi FD potrebbe essere determinata da fattori intrinseci al fitoplasma (virulenza, capacità di moltiplicazione) e non legati alla genetica del vettore.

Dalla valutazione dei campioni di viti tedesche (PGY), di ontani francesi e italiani (AldY) e di rovi infetti, è emerso, in tutti e tre i loci, che presentano una origine monofiletica comune con FD. Come si denota dalla immagine (fig. 11) , infatti tutti sono raggruppati in un ramo filogenetico comune supportato da un valore di bootstrap del 85% (*map*), 83% (*uvrB-degV*) e 68% (*secY*).

Il fitoplasma che causa l'ingiallimento dell'ontano è largamente diffuso sugli ontani europei e è stato recentemente rilevato in Italia, Francia, Svizzera, Austria, Germania e nelle regioni balcaniche, ma non è mai stato rilevato in America. Viene trasmesso tra le piante di ontano mediante *O. alni* ma può anche infettare le piante di vite. Se trasmesso a vite, può poi essere trasmesso da vite a vite, mediante *S. titanus*. Si può ipotizzare quindi che, essendo membri dello stesso sottoclado, FD sia il risultato di un adattamento di AldY alla pianta di vite. Questi risultati costituiscono una forte evidenza genetica in favore di una origine europea dell'intero

sottoclado 16SrV. Viene dunque smentita l'ipotesi di Caudwell, 1983, facendo emergere la sorprendente associazione tra due organismi venuti a contatto accidentalmente (per causa antropica) e che hanno instaurato una associazione del tutto nuova, non pre-esistente in natura.

In un' altro studio, Filippini *et al.* (2009), dimostrano che ceppi di FD infettano anche piante spontanee, *Clematis vitalba*, comunemente presenti ai margini dei vigneti. L'insetto vettore che abitualmente vive su *C. vitalba*, *Dictyophara europea*, è in grado di trasferire FD a piante di vite in condizioni di laboratorio, creando un possibile collegamento tra ciclo di FD tra piante spontanee e ciclo di FD tra piante di vite mediato da *S.titanus*. Questo dato rafforza ancor più l'ipotesi di un'origine europea di FD che avrebbe nel nostro areale ospiti spontanei alternativi alla vite e vettori alternativi a *S. titanus*.

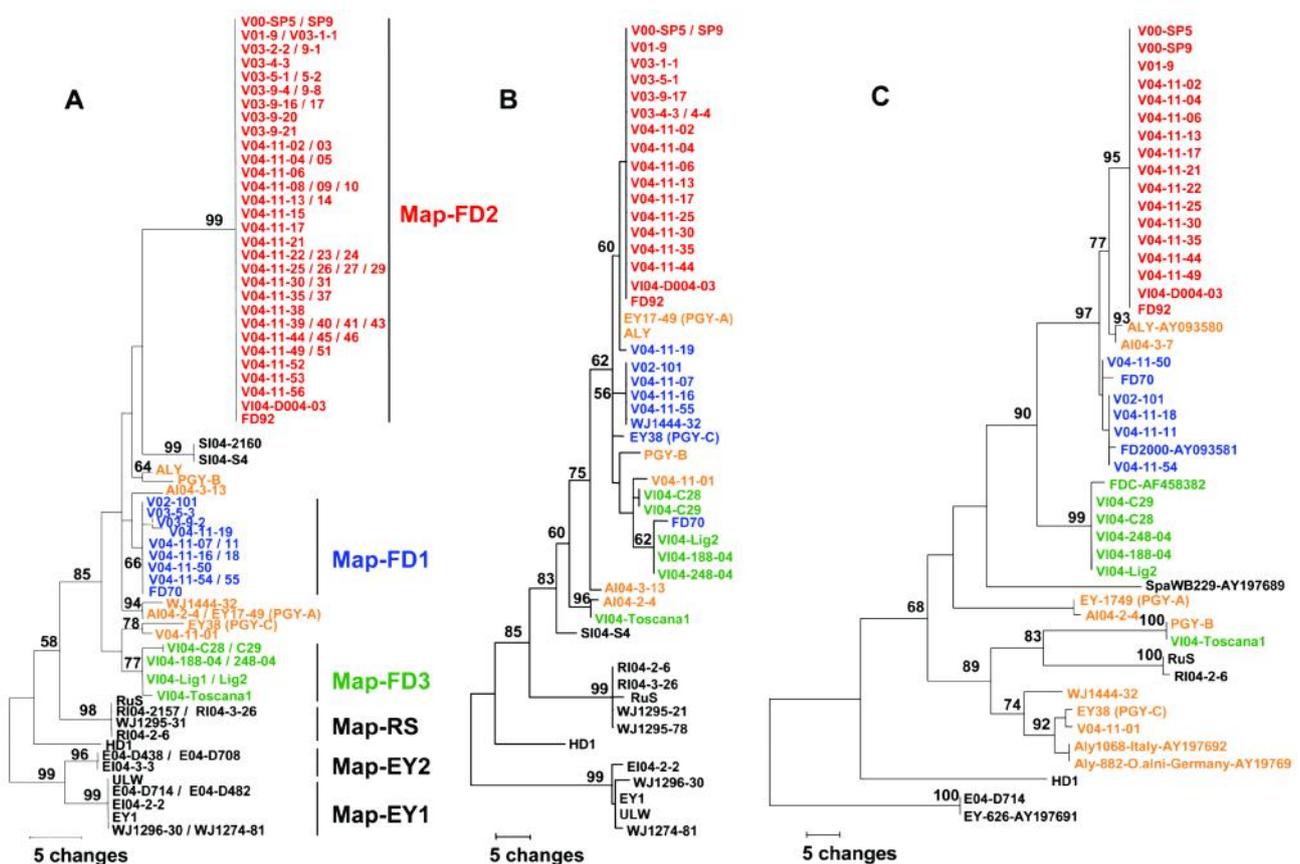


Figura 11: Alberi filogenetici costruiti mediante analisi delle sequenze dei loci genici *map* (A), *uvrB-degV* (B) e *secY* (C). I membri del cluster FD e gli isolati AldY e PGY sono colorati in blu (cluster FD1), rosso (cluster FD2), verde (cluster FD3) e arancione (AldY e PGY). I valori di bootstrap per 100 replicati sono mostrati sui rami. (1)

6) Conclusioni

L'analisi dell'origine geografica di FD della vite e del suo vettore, mediante studi di tipizzazione molecolare delle popolazioni, ha reso possibile la comprensione di un ciclo epidemiologico piuttosto sorprendente, che è il risultato di una associazione fitoplasma-vettore creata artificialmente dall'uomo ma che si è rivelata altamente efficiente, tanto da produrre epidemie gravi e molto diffuse che rappresentano uno dei fattori limitanti la viticoltura in Europa.

Dagli studi sulle popolazioni di *S. titanus*, è risultato evidente che l'insetto è originario del Nord-America, vista la grande variabilità genetica delle popolazioni neartiche. Nel suo ambiente nativo, è una specie polifaga e viene ritrovato, oltre che su vite, anche su altre specie arboree sia spontanee che coltivate. Mediante una o poche introduzioni attraverso materiale vivaistico infetto, si è insediato nel continente europeo all'interno del quale si è diffuso enormemente negli areali coltivati a vite manifestando una attitudine strettamente monofaga. Su questa specie compie una sola generazione all'anno e gli adulti, al contrario degli altri stadi giovanili, sono in grado compiere voli nei vigneti, ma non coprono grandi distanze. Inoltre è stato scoperto che i vettori infetti hanno una fitness ridotta rispetto a quelli sani ma non si può escludere che vengano trasportati dal vento o da forti temporali anche ad elevate distanze. Tuttavia non è stata riscontrata una correlazione tra distanza geografica e distanza genetica all'interno e tra le popolazioni facendo ipotizzare che la diffusione in Europa potrebbe essere attribuita ad un trasporto passivo, da parte dell'uomo, di materiale infetto contenente uova deposte sotto la corteccia delle piante di vite. Il fitoplasma FD, al contrario di quanto veniva ipotizzato nel 1983 (11), è probabilmente originario del continente europeo vista la sua similarità genetica con il fitoplasma responsabile dell'ingiallimento dell'ontano, malattia ampiamente diffusa in Europa. Grazie agli studi di popolazione di FD, è risultata evidente la grande diffusione di questo fitoplasma, oltre che su vite, anche su olmi, rovi, e piante spontanee (*Clematis vitalba*, ecc.), a testimonianza di una sua lunga evoluzione nell'ambiente paleartico.

Prima dell'introduzione di *S. titanus* in Europa, questo patogeno veniva saltuariamente

trasmesso da diversi insetti vettori, come *D. europea*, *O. alni*, sia su altri ospiti che su vite, ma quest'ultima pianta ospite rappresentava un fondo cieco in quanto non c'erano insetti vettori in grado di trasmetterlo da vite a vite.

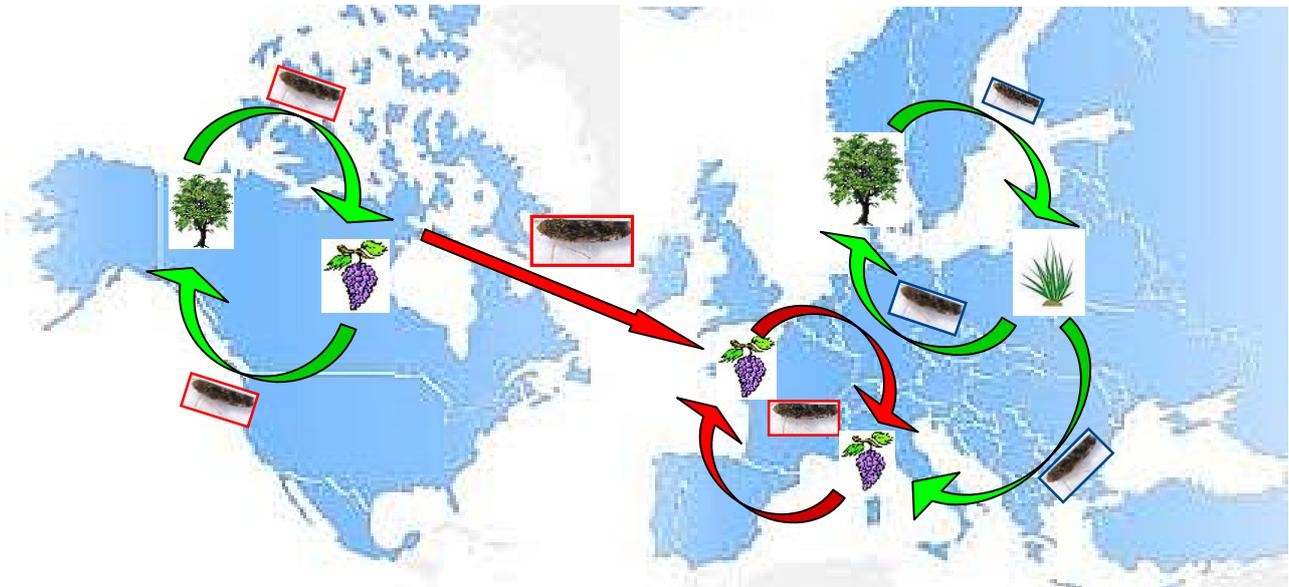


Figura 12: Schema riassuntivo della diffusione della FD e del suo vettore. Nel suo ambiente nativo (A), *S. titanus* (rettangolino rosso) si sposta tra varie piante arboree, ma FD non era presente. Nel continente europeo (B), FD è presente su olmi, ontani, rovi e piante spontanee e si sposta mediante altri vettori (rettangolino blu) tra di esse e anche su vite, ma da qui non viene spostato in quanto non c'è il vettore. Dopo l'introduzione di *S. titanus* in Europa, si è creato un nuovo ciclo epidemico in grado di diffondere FD da vite a vite (freccie rosse).

L'accidentale incontro tra questi due organismi, ha permesso la creazione di un nuovo ciclo rendendo questa malattia di grave carattere epidemico e di difficile controllo. Infatti, nonostante i continui studi in questo campo, non sono ancora stati trovati metodi di lotta abbastanza efficaci da ridurre la continua ricomparsa e diffusione della malattia.

L'introduzione di insetti esotici in nuovi ambienti, oltre a rappresentare un grave rischio in se per i danni diretti causati alle piante ospiti, può quindi comportare anche la "creazione" di nuovi cicli epidemologici, fino a quel momento sconosciuti.

7) Bibliografia

- (1) **Arnaud G, Malembic-Maher S, Salar P, Bonnet P, Maixner M, Marccone C, Boudon-Padieu E e Foissac X, 2007.** Multilocus Sequence Typing Confirms the Close Genetic Interrelatedness of Three Distinct Flavescence Dore'e Phytoplasma Strain Clusters and Group 16SrV Phytoplasmas Infecting Grapevine and Alder in Europe. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, vol 73, No. 12, p. 4001-4010
- (2) **Angelini, E., D. Clair, M. Borgo, A. Bertaccini, and E. Boudon-Padieu. 2001.** Flavescence dore'e in France and Italy: occurrence of closely related phyto-plasma isolates and their near relationships to palatinate grapevine yellows and an alder yellows phytoplasma. *Vitis* **40**:79–86.
- (3) **Angelini, E., E. Negrisolo, D. Clair, M. Borgo, and E. Boudon-Padieu. 2003.** Phylogenetic relationships among Flavescence doree strains and related phytoplasmas determined by heteroduplex mobility assay and sequence of ribosomal and nonribosomal DNA. *Plant Pathology*. **52**:663–672.
- (4) **Martini, M., E. Murari, N. Mori, and A. Bertaccini. 1999.** Identification and epidemic distribution of two flavescence dore'e-related phytoplasmas in Veneto (Italy). *Plant Dis*. **83**:925–930.
- (5) **Papura D., F. Delmotte, X. Giresse, P. Salar, J.L. Danet, M. Van Helden, X. Foissac, S. Malembic-Maher, 2009.** Comparing the spatial genetic structures of the Flavescence dorée phytoplasma and its leafhopper vector *Scaphoideus titanus*. *Infection, Genetics and Evolution* **9**(2009) 867-876
- (6) **Filippin L., J. Jović, T. Cvrković, V. Forte, D. Clair, I. Toševski, E. Boudon-Padieu, M. Borgo e E. Angelini, 2009.** Molecular characteristics of phytoplasmas associated with Flavescence dorée in clematis and grapevine and preliminary results on the role of *Dictyophara europaea* as a vector. *Plant Pathology* **58**, 826-837
- (7) **Bertin S., C.R. Guglielmino, N. Karam, L.M. Gomulski, A.R. Malacrida, G. Gasperi, 2006.** Diffusion of the Nearctic leafhopper *Scaphoideus titanus* Ball in Europe: a consequence of human trading activity. *Genetica* DOI 10.1007/s10709-006-9137-y
- (8) **Bressan A., D. Clair, O. Sémétey, E. Boudon-Padieu, 2006.** Insect injection and artificial feeding bioassays to test the vector specificity of Flavescence dorée phytoplasma. *Phytopathology* **96**: 790-796.
- (9) **Zhao Y., W Wei, R.E. Davis, I. Lee, 2010.** Recent Advances in 16S rRNA Gene-based Phytoplasma differentiation, Classification and Taxonomy. *Phytoplasmas. Genomes, Plant Host and Vector*. **5**: 64-85
- (10) **Pajoro M.** Tesi di dottorato di ricerca in entomologia agraria: Caratterizzazione molecolare e tipizzazione biogeografica della microflora associata a *Scaphoideus titanus* Ball, vettore del fitoplasma agente causale della Flavescenza dorata. Università degli studi di Torino
- (11) **Caudwell A. 1983.** L'origine des jaunisses à mycoplasmes (MLO) des plantes et l'exemple des jaunisses de la vigne. *Agronomie* , **3** (2). 103-111

-
- (12) **Bertaccini A., P. Braccini. 2005.** Flavescenza dorata e altri giallumi della vite in Toscana e in Italia. Quaderno ARSIA 3/2005
- (13) **La flavescenza dorata e il legno nero della vite. Manuale per combattere i fitoplasmi.** Provincia di Asti, giugno 2007.
- (14) **Bressan A., V. Girolami, E. Boudon.Padieu, 2005a.** Reduced fitness of the leafhopper vector *Scaphoideus titanus* exposed to Flavescence dorée phytoplasma. *Experimentalis et Applicata* 115, 283-290.
- (15) **Torres E., Botti S., Rahola J., Blanco V., Martin M.P., Bertaccini A., 2003.** Molecular characterisation and geographical distribution of Flavescence dorée-phytoplasmas in Spain. Abstract esteso dal 14° Meeting ICVG, pp. 87-88. Locorotondo (Bari), 12-17th September, 2003.