

Il germoplasma di vite Georgiano: possibile fonte di resistenza a malattie associate a fitoplasmi?

Fabio Quaglino^{1*}, David Maghradze², Paola Casati¹, Osvaldo Failla¹, Piero Attilio Bianco¹

¹ Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali, Produzione, Territorio, Agroenergia, Università di Milano

² Istituto di Orticoltura, Viticoltura ed Enologia, Università Agraria della Georgia, Tbilisi

Is the Georgian grapevine germplasm a possible source of resistance against diseases associated with phytoplasmas?

Abstract. Preliminary survey highlighted that bois noir disease, associated with ‘*Candidatus Phytoplasma solani*’, affects grapevine varieties in Georgia (South Caucasus). In this study, further research was carried out to investigate the bois noir symptom severity in international and Georgian native varieties. Identification and characterization of phytoplasmas was performed by analysis of *16S rRNA*, *vmp1* and *stamp* gene sequences. During field surveys, moderate/mild and severe symptoms were observed on Georgian grapevine varieties and international cultivars, respectively. Molecular characterization of ‘*Candidatus Phytoplasma solani*’ revealed the presence of 11 genetically distinct types. Ten of such types were described here for the first time. Phylogenetic analyses of *vmp1* and *stamp* gene concatenated nucleotide sequences indicated that ‘*Candidatus Phytoplasma solani*’ strains in Georgia are associated mainly with the bindweed-related bois noir host system. Moreover, the presence of the same strains in grapevine cultivars showing a range of symptom intensity suggested a different susceptibility of Georgian local varieties to bois noir. Further studies are in progress to evaluate this important topic in the perspective of improving breeding programs for the production of novel grapevine cultivars resistant to phytoplasma diseases.

Key words: MLST, PCR, phylogeny, stolbur, *Vitis vinifera*.

Introduzione

Il Legno nero (LN) è una malattia appartenente al complesso dei giallumi della vite (GY), responsabile

di forti perdite produttive in Europa e nel bacino del Mediterraneo. LN è causato da fitoplasmi della specie ‘*Candidatus Phytoplasma solani*’ (CaPsol), trasmessi a vite da *Hyalesthes obsoletus* Signoret, un cixiide polifago che vive preferenzialmente su ortica e, convolvolo (Quaglino *et al.*, 2013). A causa di questa complessità biologica, è molto difficile progettare strategie efficaci per il contenimento di LN. Uno degli approcci più innovativi si basa sulla selezione di varietà resistenti da impiegare in programmi di *breeding*. A questo riguardo, il germoplasma di vite Georgiano, composto da oltre 500 cultivars, è di grande interesse. Studi recenti hanno evidenziato che varietà di vite selezionate nei centri di domesticazione, come la Georgia, mostrano una possibile resistenza a patogeni (Imazio *et al.*, 2013). In uno studio preliminare, CaPsol è stato rilevato in vite in Georgia (Quaglino *et al.*, 2014).

In questo lavoro sono state condotte attività di campo e di laboratorio per studiare (i) l’intensità dei sintomi tipici di GY su varietà di vite internazionali e autoctone in Georgia e (ii) la variabilità genetica tra i ceppi di CaPsol identificati.

Materiali e metodi

Nel settembre 2013 monitoraggi in vigneti e collezioni georgiani sono stati condotti per valutare la presenza e l’intensità dei sintomi associati a GY su varietà sia internazionali (4) sia autoctone (27). Le varietà sono state classificate in gruppo I (sintomi lievi), II (moderati) e III (gravi). Il DNA, estratto da campioni fogliari raccolti da 81 piante di vite e da 6 di convolvolo, è stato utilizzato per l’identificazione e la caratterizzazione molecolare dei fitoplasmi mediante (i) amplificazione specifica (PCR), (ii) restrizione enzimatica (RFLP) e (iii) analisi delle sequenze nucleotidiche dei geni *16S rRNA*, *vmp1* e *stamp*. L’analisi (iii) è stata effettuata su 15 ceppi di CaPsol selezionati sulla base dei profili RFLP del gene *vmp1*.

* fabio.quaglino@unimi.it

L'associazione tra i profili RFLP del gene *vmp1* e l'intensità dei sintomi osservati è stata valutata con il test del χ^2 (SPSS).

L'analisi filogenetica, condotta con il software MEGA 6, è stata effettuata sulle sequenze nucleotidiche concatenate dei geni *vmp1* e *stamp*, ottenute in questo lavoro e disponibili in Banca Dati (NCBI).

Risultati e discussione

L'analisi PCR/RFLP del gene *16S rRNA* ha permesso di rilevare CaPsol in 55 piante di vite su 81 e nei convolvoli esaminati, confermando la diffusione di LN in Georgia. L'analisi RFLP del gene *vmp1*, condotta su 49 prodotti PCR (43 da vite e 6 da convolvolo), ha generato 6 profili distinti: 3 noti (V1, V14, V15) e tre (und1, und2 e und3) descritti per la prima volta. V1, V14 e und2 sono risultati prevalenti, confermando la presenza di V14 in Europa orientale e sottolineando l'inaspettata diffusione di V1 (rilevato soprattutto in Chardonnay), finora riportato in Italia, Francia e Germania (Foissac *et al.*, 2013). Questa evidenza suggerisce la probabile introduzione di V1 in Georgia mediante l'importazione di materiale di propagazione infetto.

Nei monitoraggi è stato possibile osservare sintomi lievi/moderati sulla maggior parte delle varietà georgiane e sintomi intensi sulle varietà internazionali. Questo dato assume maggior interesse considerando che i profili V1, V14 e und2 sono stati identificati con distribuzione significativamente differente ($\chi^2 = 16.671$; d.f. = 10; $P = 0.029$) in varietà che mostravano sintomi gravi, moderati e lievi.

L'analisi delle sequenze nucleotidiche dei geni *vmp1* e *stamp* ha consentito di identificare 11 ceppi di CaPsol in Georgia, 10 descritti per la prima volta.

L'analisi filogenetica ha evidenziato la presenza di

5 raggruppamenti (*clusters*): 4 (*vmp/stamp*-1, -2, -3, -5) contenenti ceppi di CaPsol associati a convolvolo, e 1 (*vmp/stamp*-4) a ortica. La maggior parte dei ceppi georgiani (13 su 14) è risultata raggruppata in *clusters* associati a convolvolo.

Conclusioni

I risultati di questo lavoro hanno evidenziato che i ceppi di CaPsol, identificati in Georgia, costituiscono una popolazione unica, associata prevalentemente a convolvolo. Inoltre, la presenza degli stessi ceppi di CaPsol in varietà di vite autoctone (sintomi lievi) e internazionali (sintomi intensi) ha suggerito che le varietà native georgiane siano meno suscettibili a LN. Ulteriori studi sono in atto per valutare questo aspetto nella prospettiva di migliorare i programmi di *breeding* per la costituzione di nuove varietà di vite tolleranti o resistenti alle fitoplasmosi.

Bibliografia

- FOISSAC X., CARLE P., FABRE A., SALAR P., DANET J.-L., STOLBUR-EUROMED CONSORTIUM, 2013. 'Candidatus *Phytoplasma solani*' genome project and genetic diversity in the Euro-Mediterranean basin. In: E. Torres, A. Laviña, A. Batlle eds., Proceedings of the 3rd European Bois Noir Workshop, Barcelona (Spain): 11-13.
- IMAZIO S., MAGHRADZE D., DE LORENZIS G., BACILIERI R., LAUCOU V., THIS P., SCIENZA A., FAILLA O., 2013. *From the cradle of grapevine domestication: molecular overview and description of Georgian grapevine (Vitis vinifera L.) germplasm*. Tree Genetics and Genomes, 9: 641-658.
- QUAGLINO F., MAGHRADZE D., CHKHAIDZE N., FAILLA O., CASATI P., BIANCO P.A., 2014. *First report of 'Candidatus Phytoplasma solani' and 'Candidatus Phytoplasma convolvuli' associated with grapevine bois noir and bindweed yellows, respectively, in Georgia*. Plant Disease, 98: 1151.
- QUAGLINO F., ZHAO Y., CASATI P., BULGARI D., BIANCO P.A., WEI W., DAVIS R.E., 2013. 'Candidatus *Phytoplasma solani*', a novel taxon associated with stolbur and bois noir related diseases of plants. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 63: 2879-2894.