

Aggiornamento sharka: diagnostica, epidemiologia, risposta varietale, prevenzione, le ricerche in atto

Vito Savino*¹, Anna Rosa Babini², Claudio Ratti³, Domenico Missere⁴, Federica Fontana⁵, Carlo Fideghelli⁶, Graziella Pasquini⁷, Angelantonio Minafra⁸, Francesco Palmisano⁹

¹Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta e degli Alimenti, Università di Bari 'A. Moro'

²Servizio Fitosanitario Regione Emilia-Romagna, Bologna

³Dipartimento di Scienze Agrarie - Patologia Vegetale, Università di Bologna

⁴CRPV Centro Ricerche Produzioni Vegetali, Cesena

⁵ASTRA Unità Operativa Martorano 5, Cesena

⁶CREA - Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e l'Analisi della Economia Agraria - Centro di Ricerca per la Frutticoltura, Roma

⁷CREA - Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e l'Analisi della Economia Agraria - Centro di Ricerca per la Patologia Vegetale, Roma

⁸Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante, Consiglio Nazionale delle Ricerche, UOS Bari

⁹Centro di Ricerca, Sperimentazione e Formazione in Agricoltura, Locorotondo (BA)

Progresses in research against Plum Pox Virus

Abstract. Diffusion of PPV in major peach growing areas in Italy, and the rapid spread of M strain, push either research and industry for a renewed strategy of containment. Improved and fast diagnosis by molecular tools on symptomless trees, correct genotyping of incoming strains potentially dangerous on peach, search for tolerance traits in *Prunus* germplasm to be incorporated by breeding and marker-assisted selection in new cultivars, should all implement a wide monitoring in commercial orchards and nurseries and an enforced certification of propagative materials. Application of new genetic tools derived by silencing mechanism of viral RNA could be also envisaged on rootstocks and nested cultivars, while efforts in selection of new cultivars with a high degree of tolerance (no or reduced symptoms, low virus replication, commercially suitable fruits) are the future perspectives to allow profitable peach growing in endemic areas.

Keywords: plum pox virus, peach, molecular diagnosis, certification, varietal susceptibility.

Introduzione

Nelle strategie di contenimento di virus da quarantena come *Plum pox virus* (PPV), le più promettenti

ricerche mirano a (i) migliorare sensibilità e tempi della diagnosi, (ii) definire l'epidemiologia dei ceppi virali e (iii) identificare nella pianta geni induttori di potenziale resistenza alla replicazione virale e loro meccanismi d'azione.

Diagnosi

L'importanza della evoluzione della diagnostica nell'incrementare non solo sensibilità e specificità dei saggi, ma per ridurre tempi e costi, si evidenzia dagli sforzi più recenti della ricerca per la elaborazione di protocolli sierologici e molecolari validati da una rete nazionale di laboratori mediante *ring-test* (Pasquini *et al.*, 2013). Fra le più recenti tecniche di diagnosi, la LAMP (*Loop-mediated isothermal amplification*) si caratterizza per la sua elevata sensibilità e per la rapidità di esecuzione (fig. 1). La sua applicazione in sistemi che prevedono l'uso di termociclatori portatili e di reagenti *ready to use*, ha reso possibile la sua esecuzione da parte di personale non specializzato ed è particolarmente idoneo per la diagnosi precoce di PPV direttamente in campo. Un kit commerciale per la diagnosi di PPV basato su tecnologia LAMP, validato presso il CRA-PAV di Roma, ha prodotto risultati comparabili con *real time* RT-PCR (Pasquini *et al.*, 2014). Ultima tecnica introdotta e applicata per la diagnosi di PPV è l'*AmplifyRP*, che permette, in circa 30 minuti, una rilevazione altamente specifica e sensibile. Questa si basa su un nuovo protocollo di amplificazione isoterma mediata da una polimerasi-

* vitonicola.savino@uniba.it

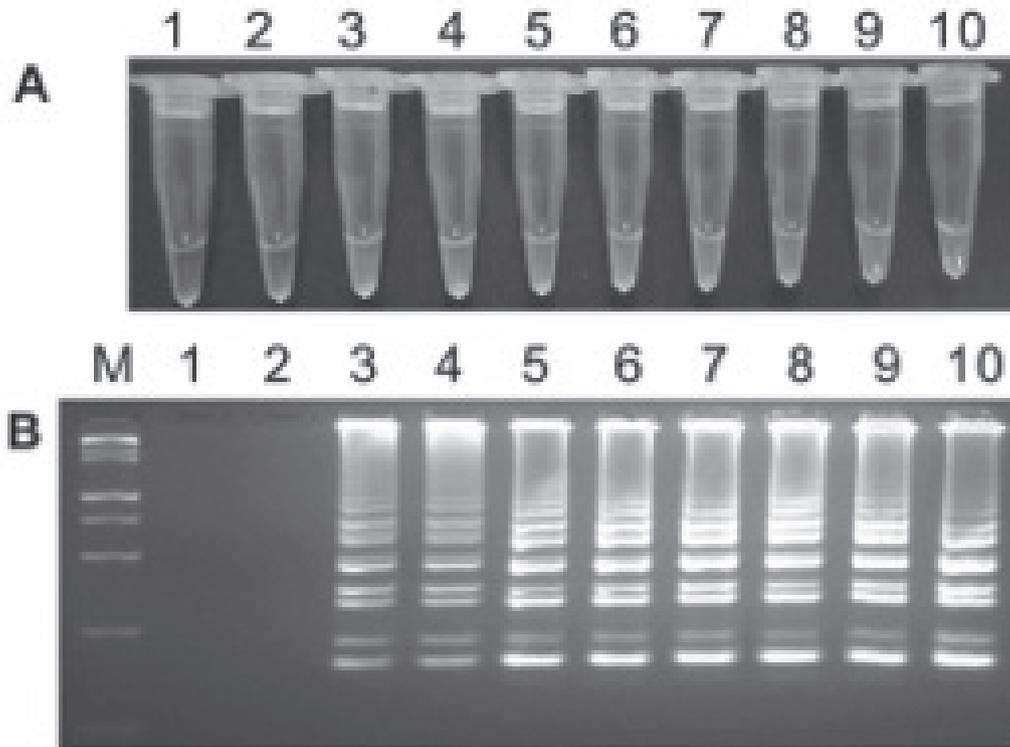


Fig. 1- Esempio di rilevamento di reazioni LAMP in diluizioni decimali di RNA totale di piante infette da PPV in (A) tubo (reazione colorimetrica) e (B) elettroforesi su gel.

Fig.1 - Exemplified model of LAMP detection from RNA dilutions of PPV infected plant by (A) colorimetric reaction in tubes or (B) agarose gel electrophoresis.

ricombinasi e associata a rilevazione fluorescente o colorimetrica (Zhang *et al.*, 2014). Comunque, il metodo diagnostico più largamente utilizzato nei diversi laboratori accreditati per la diagnosi dei campioni provenienti dal monitoraggio in Emilia-Romagna è il test ELISA, eseguito principalmente su foglie con sospetti sintomi. Per il controllo analitico delle piante nella filiera vivaistica, con prelievo di campioni asintomatici, si impiega preferibilmente lo *spot real-time RT-PCR* (Capote *et al.*, 2009). I controlli analitici effettuati complessivamente in campi di piante madri e vivai in Emilia Romagna nel biennio 2012-2013 hanno riguardato 3.134 campioni.

Epidemiologia

Il virus della vaiolatura del susino (PPV), agente causale della malattia, presenta una elevata variabilità genetica che si manifesta con la distinzione di nove ceppi differenti. In passato, la maggior parte degli isolati del virus erano assegnati, su base sierologica, a uno dei due ceppi maggiori, PPV-M (Marcus) e PPV-D (Dideron), oppure a uno dei due ceppi minori, PPV-C (Cherry) e PPV-EA (El Amar). In seguito, l'introduzione di nuove tecniche molecolari ha permesso l'individuazione di ulteriori cinque ceppi: PPV-Rec (Recombinant), PPV-W (Winona), PPV-T (Turchia),

PPV-CR (Cherry russo) e PPV-An (Ancestrale). Tra questi, gli ultimi quattro ceppi sono stati individuati per la prima volta negli ultimi dieci anni, rispettivamente, in Canada, Turchia, Russia e Albania (Glasa *et al.*, 2013).

L'individuazione in Albania dell'isolato ancestrale PPV-An potrebbe svolgere un ruolo primario nell'ampliare le conoscenze sull'area di origine del virus, sull'epoca di comparsa nello scenario epidemiologico e sulla modalità di diffusione dei ceppi. Infatti, si tratta di una variante virale che attraverso eventi di ricombinazione, con isolati Dideron, ha dato origine agli isolati Marcus e Turkey (Palmisano *et al.*, 2012).

Recenti studi di caratterizzazione genetica condotti su isolati individuati in Italia, nell'ambito di diversi progetti, hanno permesso di accertare la presenza su pesco di varianti Marcus ed in misura estremamente inferiore di Dideron, mentre nessun isolato ricombinante è stato trovato su questa specie. Pur appartenendo allo stesso virus, PPV-D e PPV-M rivestono ruoli ed importanza diversi nell'impatto sull'industria peschicola. Infatti, su pesco, il ceppo Marcus ha effetti molto più nefasti, sia per la rapidità e l'efficacia con cui gli afidi possono diffondere la malattia che per la capacità di indurre sintomi che deprezzano significativamente il prodotto. E' per questo motivo che la diffusione della Sharka, avviata in Italia nei primi anni

'70 con focolai di ceppo Dideron, in una prima fase è stata relativamente lenta e controllata con discreta efficacia fino a quando, all'inizio degli anni '90, è iniziata la diffusione del ceppo Marcus con un deciso cambio di marcia nella diffusione della malattia, coinvolgendo pesantemente il comparto peschicolo. E' anche per tale ragione che, dopo la diffusione del ceppo Marcus in comprensori del Veneto, della Lombardia e dell'Emilia Romagna, dove sono state delimitate delle "zone insediamento", lo stesso ceppo ha cominciato ad invadere anche comprensori peschicoli fino ad allora incontaminati come alcune aree della Basilicata e della Puglia.

Suscettibilità varietale

L'uso di genotipi resistenti/tolleranti al *Plum pox virus* rappresenta l'unico sistema efficace per il controllo della malattia in termini di risultati e durata, soprattutto nelle aree in cui il virus è ormai presente in forma endemica (zone d'insediamento). Ciò è particolarmente importante per il pesco, la cui produzione in Italia è seriamente compromessa sia in termini qualitativi che quantitativi dalla presenza del ceppo Marcus. Attualmente, nessuna forma di resistenza naturale è stata individuata in questa specie, per cui forme di resistenza/tolleranza sono state ricercate in specie affini al pesco e/o a specie selvatiche quali *Prunus davidiana* e *Prunus dulcis* (Decroocq *et al.*, 2005; Marandel *et al.*, 2009).

Considerata l'importanza che riveste l'individuazione di genotipi resistenti/tolleranti alla malattia, il germoplasma di pesco è sottoposto a valutazione per resistenza/tolleranza a PPV nell'ambito di diversi Progetti nazionali e regionali.

Di frequente, il sistema di valutazione adottato è stato quello proposto da Amenduni *et al.* (2004) basato sul confronto fra l'espressione sintomatologica indotta dal virus e la valutazione della presenza/assenza di particelle virali all'interno dei tessuti degli ospiti infettati mediante saggio diagnostico. La terminologia adottata per definire il tipo di reazione all'infezione virale ('immune', 'resistente', 'tollerante', 'sensibile') risponde ai concetti espressi in Cooper e Jones (1983) (tab. 1).

Il CRA-PAV mantiene in *screen-house* le piante sottoposte a valutazione sintomatologica e diagnostica a partire dal primo anno successivo all'infezione per innesto. Otto selezioni derivate da incroci 'Maria Aurelia' x l'ibrido F1 SD45 (*P. persica* x *P. davidiana*) e 5 varietà ottenute da incroci tra cultivar di pesco commerciali e una selezione di nettarina pendula (S2678) sono risultate resistenti, tolleranti o altamente

Tab. 1 - Schema di classificazione della risposta di germoplasma di pesco all'infezione da PPV.

Tab. 1 - Classification scheme of peach germplasm response to PPV infection.

	Sintomi	Elisa	rt RT-PCR	Classificazione
Selezione	+	+	+	sensibile
	-	+	+	tollerante
	-	+	+	altamente tollerante*
	-	-	+	resistente
	-	-	-	immune

* Assenza di sintomi su tutti gli organi della pianta

tolleranti (Liverani *et al.*, 2011). Dopo otto anni di valutazione questi genotipi rimangono ancora asintomatici, pur continuando a risultare positivi per la presenza del virus all'analisi molecolare o sierologica (tab. 2).

Inoltre, la Regione Emilia Romagna sostiene, dal 2003, una sperimentazione per valutare la sensibilità di nuove cultivar e selezioni ed eventualmente orientarne l'utilizzo nelle zone sottoposte a forte pressione

Tab. 2 - Risultati della valutazione di germoplasma di pesco per la suscettibilità a PPV.

Tab. 2 - Susceptibility results from phenotypic analysis of peach germplasm to PPV infection.

Accessione	Classe
DOFI 023 ^(*)	altamente tollerante
DOFI 045 ^(*)	resistente
DOFI 061 ^(*)	resistente
DOFI 063 ^(*)	resistente
195R-XLII-127 ^(**)	resistente
394Q-XXXVII-52 ^(**)	tollerante
393Q-XIV-55 ^(**)	altamente tollerante
194R-XXXIX-65 ^(**)	resistente
194Q-XXXIX-100 ^(**)	altamente tollerante
195R-XLIII-123 ^(**)	altamente tollerante
194Q-XXXIX-118 ^(**)	resistente
394Q-XXXVII-55 ^(**)	resistente
Ghiaccio	altamente tollerante
Sel 95-277	altamente tollerante
Summer Lady*	tollerante
Alipersiè	tollerante
Plagold 10	tollerante
UFO 3	tollerante
Tastired	tollerante
Fiamma	tollerante
Sel IFF 650	tollerante

* semenzali di 'Maria Aurelia' x ibridi F1 SD45 (*Prunus persica* × *Prunus davidiana*)

** semenzali ottenuti da incrocio fra varietà commerciali ed una selezione di nettarina S2678

di inoculo. Tali prove hanno permesso l'individuazione di alcune varietà e selezioni di pesco che dimostrano tolleranza. Queste varietà e selezioni si infettano con PPV e risultano più o meno sintomatiche; invece, solo 2 (Ghiaccio e Sel 95-277) risultano asintomatiche su foglie e frutti (tab. 2). Questi risultati, ottenuti in un ambiente confinato, dovranno essere confermati da osservazioni in pieno campo, poiché comparsa e intensità dei sintomi di Sharka sono influenzate dall'isolato virale, dalle condizioni di coltivazione e dall'andamento climatico. Infine, sia da osservazioni di campo eseguite in pescheti ubicati in "zone di insediamento" in Veneto ed Emilia-Romagna che da ulteriori prove sperimentali, sono state ricavate ulteriori informazioni sulle suscettibilità varietali a PPV, intesa come entità di sintomi sui frutti, di differenti genotipi di pesco (tab.3) (Fideghelli, com. pers.).

Prevenzione e procedure di contenimento

Trattandosi di una malattia di origine virale le misure di lotta sono esclusivamente di tipo preventivo, attuate attraverso norme legislative, che hanno come obiettivo quello di impedire l'ingresso della malattia in una determinata zona oppure di limitarne la sua diffusione, una volta riscontrata. Il Ministero per le Politiche Agricole Alimentari e Forestali, con Decreto Ministeriale 28 luglio 2009, rende obbligatoria la lotta contro il virus della Sharka e prevede che i diversi Servizi Fitosanitari Regionali delimitino sul territorio ai sensi del DM, le "aree contaminate", le "zone tampone" e le "zone di insediamento". Di seguito, si riportano i dati che si riferiscono alla delimitazione delle succitate aree nelle Regioni dell'Emilia-Romagna, Veneto e Puglia.

In ottemperanza al DM succitato, si è provveduto, in Emilia-Romagna, all'istituzione di 9 zone di insediamento, progressivamente ampliate; si è passati dai 12.590 ha nel 2010 ai 26.288 ha nel 2014. Le aziende agricole colpite vengono tuttavia aiutate a contenere

l'impatto economico della malattia, continuando il monitoraggio con l'aiuto di tecnici almeno una volta all'anno e provvedendo all'estirpo immediato di tutte le piante sintomatiche (mediamente di 10 piante ad ettaro per anno). Inoltre, qualora si opti per il reimpianto di drupacee suscettibili, viene raccomandato l'uso di astoni di categoria 'certificato VF' (*virus-free*), in aree non contigue ad impianti già infetti, ma separate da altre specie arboree non ospiti (vigneti, meleti). Permane comunque l'esigenza di effettuare un monitoraggio estensivo, in tutte le regioni vocate, per la perimetrazione delle zone esenti da PPV, al fine di individuare le aree ben isolate da ogni possibile fonte di contaminazione e quindi ancora disponibili all'insediamento di vivai di drupacee.

Inoltre, l'attività di monitoraggio effettuata in Puglia ha permesso di verificare, negli ultimi anni, l'espansione dell'epidemia dovuta al ceppo Marcus ed, in particolare, nel biennio 2011-2012, sono state dichiarate "zone contaminate", nuove aree in agro di S. Ferdinando di Puglia, Novoli, Cerignola, Canosa di Puglia, Barletta, Andria e Trinitapoli.

Infine, il monitoraggio eseguito in Veneto ha permesso di delimitare delle "zone di insediamento", nella campagna 2010-2011, che interessano le principali aree peschicole regionali ed, in particolare, 20 comuni della provincia di Verona e 2 comuni della provincia di Padova.

Una ulteriore strategia di intervento nel contenimento della malattia consiste nell'analisi di librerie di sequenziamento massale di *smallRNA* e di trascrittoma, estratti da varietà di pesco suscettibili o apparentemente tolleranti a PPV, che evidenziano percorsi metabolici differenziali durante l'infezione virale. L'inoculo di PPV-M su cv Kamarat (tollerante/priva di sintomi) e NJ Weeping (suscettibile/sintomatica) produce un notevole incremento, nella varietà sintomatica, di miRNA159 e 396, implicati nella regolazione della morfogenesi fogliare (Palmisano, com. pers.).

L'identificazione di particolari *small interfering RNA*, prodotti del silenziamento genico di RNA virale, può risultare utile per indurre una resistenza costitutiva e durevole (Ilardi e DeNicola-Negri, 2011). A questo riguardo, si sta studiando su pesco (Progetto PRIN-MIUR 'Strategie molecolari per l'acquisizione della resistenza al virus della vaiolatura del susino in pesco e albicocco' 2014-2016) la traslocazione sistemica di segnali che scatenano il silenziamento genico per verificare il 'trasferimento' di resistenza da un portinnesto trasformato ad un nesto varietale convenzionale e potenzialmente esposto ad inoculazione mediante afidi.

Tab. 3 - Cultivar di pesco e nettarine, infette da PPV, che non mostrano sintomi sui frutti.

Tab. 3 - Peach and nectarines cultivars, infected by PPV, without any fruit symptom.

Pesche gialle	Pesche bianche	Nettarine gialle
Blaze Prince	Alipersiè	Natasha
Dialona	Buco Incavato	Weinberger
Plagold 10	Plawhite 5	Zee Diamond
Summer Lady	Romagna Flat	
Suncrest	UFO 3	
Tastired		

Conclusioni

Dato l'incremento della diffusione della malattia su pesco in Italia ed il potenziale rischio rappresentato dall'eventuale ingresso/comparsa di nuovi ceppi aggressivi, occorre continuare il monitoraggio soprattutto nei vivai e la eradicazione mirata nei campi commerciali. La caratterizzazione di nuove fonti genetiche di resistenza in *Prunus*, permetterà il trasferimento di tali resistenze con metodi di miglioramento genetico classico. E' quindi auspicabile la diffusione, negli areali endemici, di varietà tolleranti e comunque a ridotta replicazione virale (per ridurre il potenziale di inoculo nella trasmissione per afidi) e fruttificazione commerciabile.

E' infine da verificare, con sperimentazioni mirate, la possibile resistenza indotta geneticamente su varietà o portinnesti tramite induzione di *silencing*, con costrutti che interferiscano specificamente con la replicazione virale.

Considerate le sempre più frequenti segnalazioni di "zone di insediamento" e di "zone contaminate", al fine di rallentare la diffusione della sharka è auspicabile l'attuazione di un Piano Nazionale coordinato di interventi che contempli, prioritariamente, l'applicazione uniforme, in tutte le Regioni, della normativa obbligatoria vigente.

Riassunto

La diffusione di PPV, soprattutto del ceppo M, nelle regioni italiane vocate alla peschicoltura preme verso un rinnovato sforzo di contenimento. La diagnosi molecolare più rapida su piante asintomatiche, la precisa identificazione dei ceppi potenzialmente dannosi su pesco, la ricerca di fattori genetici di tolleranza nel germoplasma per incroci classici e selezione assistita, devono accompagnare un ampio monitoraggio di frutteti e vivai e la rigorosa certificazione del materiale di propagazione. Prospettive che permettano una redditizia coltivazione anche in aree a infezione endemica possono essere l'inserzione di costrutti derivanti dallo studio del silenziamento genico di RNA virale per indurre resistenza in portinnesti e varietà e, soprattutto, gli sforzi di selezione di

cultivar altamente tolleranti (senza sintomi e a bassa replicazione virale).

Parole chiave: *Plum pox virus*, pesco, diagnosi molecolare, certificazione, suscettibilità varietale

Bibliografia

- AMENDUNI T., BAZZONI A., MINAFRA A., SAVINO V., 2004. *Evaluation of the susceptibility of seedlings from apricot crosses to the Marcus strain of Plum pox virus*. Acta Hort. (ISHS), 657:305-308
- CAPOTE N., BERTOLINI E., OLMOS A., VIDAL E., MARTÍNEZ M.C., CAMBRA M., 2009. *Direct sample preparation methods for the detection of Plum pox virus by real-time RT-PCR*. Int. Microbiol., 12:1-6.
- COOPER J.I., JONES A.T., 1983. *Responses of plants to viruses: proposals for the use of terms*. Phytopathology 73: 127-128
- DECROOCQ V., FOULONGUE M., LAMBERT P., LE GALL O., MANTIN C., PASCAL T., SCHURDI-LEVRAUD V., KERVELLA J., 2005. *Analogues of virus resistance genes map to QTLs for resistance to sharka disease in Prunus davidiana*. Molecular Genetic and Genomics, 272: 680-689.
- GLASA M., PRIKHODKO Y., PREDAJŇA L., NAGYOVÁ A., SHNEYDER Y., ZHIVAEVA T., ŠUBR Z., CAMBRA M., CANDRESSE T., 2013. *Characterization of Sour Cherry Isolates of Plum pox virus from the Volga Basin in Russia Reveals a New Cherry Strain of the Virus*. Phytopatology 103: (9), 972-979.
- ILARDI V., DI NICOLA-NEGRI E., 2011. *Genetically engineered resistance to Plum pox virus infection in herbaceous and stone fruits hosts*. GM Crops, 2 (1): 24-33.
- LIVERANI A. ET AL., 2011. *Il miglioramento genetico per la resistenza a sharka in pesco: risultati del progetto italiano PPV-CON*. Italus Hortus, 1 (8): 35-44.
- MARANDEL G., PASCAL T., CANDRESSE T., DECROOCQ V., 2009. *The quantitative resistance to Plum pox virus in Prunus davidiana P1908 is tightly linked to different components of the eucaryotic translation initiation complex*. Plant Pathology, 58: 425-435.
- PALMISANO F., BOSCIA D., MINAFRA A., MYRTA A., CANDRESSE T., 2012. *An atypical Albanian isolate of Plum pox virus could be the progenitor of the Marcus strain*. Petria, 22 (3): 33.
- PASQUINI G., BIANCO P.A., BOSCIA D., CAMPUS L., CASATI P., DIGIARO M., PALMISANO F., POGGI-POLLINI C., PUNELLI F., RUBIES C., 2013. *Protocollo diagnostico per Plum pox virus (PPV)*. Petria, 23 (2): 351-394.
- PASQUINI, G. FERRETTI, L., LOPRIORE, S., AIROLDI, G., BARBA, M., 2014. *Validation of a rapid and sensitive diagnostic protocol for the identification of plum pox virus: LAMP RT-PCR*. Journal of Plant Path., XX Conv. Naz. SIPaV, Pisa, 22-24 settembre 2014: 35
- ZHANG S., RAVELONANDRO M., RUSSELL P., MCOWEN N., BRIARD P., BOHANNON S., VRIENT A., 2014. *Rapid diagnostic detection of Plum pox virus in Prunus plants by isothermal AmplifyRP using reverse transcription-recombinase polymerase amplification*. J Virol Meth, 207: 114 – 120.