



GIOVANI SÌ



Regione Toscana



AMARCORT - Antico gerMoplAsma stoRiCo Ortofrutticolo



WP11

Report 16: Report sull'indagine virologica effettuata sulle antiche varietà di frutta selezionate

Partner:

Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Agro-ambientali (DiSAAA-a)

Progetto AMARCORT -Diagnosi fitovirologica (WP 11)

Pedrelli A., Panattoni A., Cetrozzi L., Nali C.

Dipartimento di Scienze agrarie, Alimentari e Agro-Ambientali (DiSAAA-a), Università di Pisa,
Via del Borghetto 80, 56124 Pisa, Italia

Introduzione

Le varietà arboree antiche selezionate all'interno del progetto Antico germoplasma storico ortofrutticolo (AMARCORT) sono state oggetto di indagini di laboratorio al fine di verificarne le condizioni fitosanitarie (nello specifico lo *status* virologico) e selezionare piante idonee alla moltiplicazione (Work Package 11). La presenza di agenti virali è responsabile sia di danni diretti (es. riduzione delle rese e della qualità) che indiretti (es. espunti, smaltimento del materiale infetto) che generano un forte impatto in termini economici (e non solo) lungo tutta la filiera agro-alimentare. Non esistendo metodi curativi ed essendovi come unica soluzione la distruzione delle piante infette, l'unica strategia di difesa attuabile è quella della prevenzione. La diagnosi di laboratorio e la comprensione dei meccanismi che intercorrono tra virus, pianta e ambiente giocano quindi un ruolo fondamentale nel monitoraggio e controllo di questi patogeni.

Materiali e metodi

Il personale specializzato del Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Agro-ambientali (DiSAAA-a) dell'Università di Pisa ha condotto saggi diagnostici su un totale di 85 piante. In dettaglio, quattro di albicocco (*Prunus armeniaca*) cv. Ammiraglia e quattro di albicocco (*Prunus armeniaca*) cv. Maharani identificate in provincia di Pisa; 15 di fico (*Ficus carica*) cv. Dottato coltivate in provincia di Grosseto; 2 di noce (*Juglans regia*) cv. Nocione del Casentino, 15 di melo (*Malus domestica*) cv. Chitignano, 15 di melo (*Malus domestica*) cv. Mora, 15 di melo (*Malus domestica*) cv. Rugginosa e 15 di susino (*Prunus domestica*) cv. Coscia di Monaca presenti in provincia di Arezzo.

Le analisi sono state condotte su campioni legnosi (rami di un anno) e fogliari (foglie mature) recuperati rispettivamente nel periodo invernale (febbraio-marzo 2022) ed estivo (giugno-luglio 2022). Essi sono stati prelevati, numerati, etichettati e trasportati mantenendoli in borse frigo a bassa temperatura sino al laboratorio di Virologia vegetale del Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Agro-ambientali (DiSAAA-a) dell'Università di Pisa, ove sono stati collocati a 4°C sino al loro utilizzo. Nel periodo invernale 25 campioni legnosi sono stati saggiati. In dettaglio, il campionamento è avvenuto utilizzando il metodo dei *pool* (5 piante = 1 *pool*) applicandolo al fico cv. Dottato, al melo cv. Mora, al melo cv. Rugginosa, al melo cv. Chitignano e al susino cv. Coscia di Monaca. Per l'albicocco cv. Ammiraglia, cv. Maharani e per il noce cv. Nocione del Casentino, dato il numero inferiore a cinque, sono stati prelevati singoli campioni per pianta.

Nel periodo estivo, i campioni sono stati recuperati da ogni singola pianta appartenente ai *pool* invernali per un totale di 75. I virus oggetto di indagine e da cui il materiale vegetale deve essere esente sono stati selezionati basandosi sulla normativa vigente (Decreto Legislativo 2 febbraio 2021, n. 18) relativa alla produzione e alla commercializzazione dei materiali di moltiplicazione delle piante da frutto e delle ortive. Inoltre, si è tenuto conto della presenza storica di questi virus nel territorio toscano. In totale, i virus saggiati sono stati nove, due dei quali d'interesse solo per singole specie (noce e fico) mentre gli altri d'interesse per più specie (albicocco, melo, susino)

(Tab. 1). La presenza di anche uno solo di essi ha determinato la non idoneità del materiale vegetale selezionato.

Tab. 1. Lista dei virus saggiati e dei rispettivi ospiti.

| Nome | Acronimo | Ospiti |
|--|----------|-------------------------|
| Virus della maculatura clorotica fogliare del melo (<i>Apple chlorotic leaf spot virus</i>) | ACLSV | melo, susino |
| Virus del mosaico del melo (<i>Apple mosaic virus</i>) | ApMV | melo, susino |
| Virus dell'accartocciamento fogliare del ciliegio (<i>Cherry leaf roll virus</i>) | CLRV | noce |
| Virus del mosaico del fico (<i>Fig mosaic virus</i>) | FMV | fico |
| Virus della maculatura anulare latente del mirabolano (<i>Myrabolan latent ring spot virus</i>) | MLRSV | albicocco, susino |
| Virus associato alla butteratura e necrosi della corteccia di susino (<i>Plum bark necrosis steam pitting-associated virus</i>) | PBNPaV | albicocco, susino |
| Virus del nanismo del susino (<i>Prune dwarf virus</i>) | PDV | albicocco, susino |
| Virus della maculatura anulare necrotica dei <i>Prunus</i> (<i>Prunus necrotic ring spot virus</i>) | PNRSV | albicocco, melo, susino |
| Virus della vaiolatura delle drupacee (<i>Plum pox virus</i>) | PPV | albicocco, susino |

La diagnosi è stata condotta ricorrendo a diverse metodologie. In dettaglio, sono stati portati avanti test sierologici ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) e analisi bimolecolari tramite *End point* PCR (*Polymerase chain reaction*) e *Real time* PCR utilizzando protocolli reperiti in letteratura (Tab. 2). Nel caso dei test biomolecolari, in prima istanza vi è stata l'estrazione del materiale genetico dai campioni prelevati tramite specifico protocollo (Li et al., 2008).

Tab. 2. Metodi di analisi e protocolli utilizzati.

| Acronimo | Metodo di analisi | Protocollo |
|----------|----------------------|--|
| ACLSV | <i>Real time</i> PCR | Osman et al. (2017) |
| ApMV | <i>End point</i> PCR | Menzel et al. (2002) |
| CLRV | <i>End point</i> PCR | Werner et al. (1997) |
| FMV | <i>End point</i> PCR | Elbeaino et al. (2009) |
| MLRSV | ELISA | <i>Kit commerciale</i> (Agritest, Valenzano, Bari) |
| PBNPaV | <i>Real time</i> PCR | Al Rwahnih et al. (2007) |

| | | |
|-------|----------------------|---------------------|
| PDV | <i>Real time</i> PCR | Kim et al. (2010) |
| PNRSV | <i>Real time</i> PCR | Kim et al. (2010) |
| PPV | <i>Real time</i> PCR | Olmos et al. (2005) |

In base ai risultati ottenuti dalle indagini diagnostiche, durante il periodo estivo sono state selezionate piante di fico cv. Dottato e di susino cv. Coscia di Monaca al fine di condurre analisi di natura fisiopatologica e biochimica a livello fogliare con lo scopo di indagare le interazioni pianta/virus, concentrandosi sulle alterazioni del processo fotosintetico e lo stato idrico.

I parametri fisiopatologici misurati sono stati gli scambi gassosi (A , g_s , C_i), il contenuto di clorofille (SPAD), il contenuto relativo di acqua (RWC), il potenziale idrico (Ψ_w) e la pressione osmotica (Ψ_π) mentre, nel caso dei parametri biochimici, sono stati misurati i pigmenti fogliari (clorofille, carotenoidi e xantofille).

Le misure di fotosintesi netta (A), traspirazione (E), conduttanza stomatica (g_s) e concentrazione intercellulare di CO_2 (C_i) sono state condotte usando un sistema portatile per la misura degli scambi gassosi LI-6400 (Li-Cor, Inc., Lincoln, NE, USA). Ogni foglia utilizzata per le analisi degli scambi gassosi è stata inoltre analizzata mediante SPAD 502 (Minolta, Osaka, Giappone), strumento che permette di stimare in modo rapido e non invasivo il contenuto di clorofilla (SPAD). Per ogni campione, sono state effettuate tre misurazioni, per poi registrarne il valore medio. Il Ψ_w fogliare è stato misurato con una camera a pressione di tipo Scholander PMS 600 (PMS Instrument Company, Albany, OR, USA) (Tiekstra et al., 2000). La pressione osmotica (Ψ_π) è stata determinata con un osmometro a pressione di vapore Wescor 5500 (Wescor, Logan, UT, USA). Un'altra porzione di foglia è stata utilizzata per la determinazione di RWC (Stanton and Mickelbart, 2014). Il livello dei pigmenti fogliari sono stati valutati singolarmente mediante cromatografia ad alte prestazioni (HPLC) (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). L'elaborazione statistica dei dati è avvenuta usando il software JMP 11.0 (SAS Institute, Cary, NC, USA) e sono stati considerati valori significativi quelli in cui $p \leq 0.05$.

Nel caso del fico cv. Dottato su piante positive a *Fig mosaic virus* (FMV) sono state valutate foglie asintomatiche/negative, asintomatiche/positive e sintomatiche/positive alla diagnosi. Per quanto invece riguarda il susino cv. Coscia di Monaca, sono state condotte indagini su piante negative e positive nella diagnosi, in questo ultimo caso valutando singole infezioni da *Plum bark necrosis stem pitting associated virus* (PBNSPaV) e *Plum pox virus* (PPV) e la loro co-presenza.

Risultati e discussione

Le analisi condotte nel periodo invernale hanno rivelato la presenza di 18 campioni positivi (72%). I tre *pool* di fico cv. Dottato, quelli del melo cv. Chitignano e uno dei campioni di noce cv. Nocione del Casentino sono risultati negativi. I virus individuati sono stati cinque: ACLSV, CLRV, PBNSPaV, PNRSV e PPV. In base ai risultati ottenuti, non è stata eseguita l'indagine estiva sulle cv. di albicocco e sul noce. Il campione di noce risultato negativo è stato indirizzato alla moltiplicazione (Tab. 4).

Le analisi condotte invece nel periodo estivo hanno rivelato la presenza di 67 campioni positivi (89%). In dettaglio, solo una pianta di melo cv. Rugginosa, quattro di melo cv. Chitignano, tre di susino cv. Coscia di Monaca sono risultati negativi. I virus individuati sono stati cinque: ACLSV, FMV, PBNSPaV, PNRSV e PPV (Tab. 4).

La percentuale di infetti ottenuti nel periodo estivo è in linea con il risultato ottenuto in inverno con il metodo dei *pool* e rappresentano una riprova della correttezza della metodologia adottata.

Osservando il gruppo delle drupacee, i virus maggiormente presenti sono risultati PBNPaV e PPV, seguiti da PNRSV (Fig. 1). Nel caso delle pomacee il virus più presente è stato ACLSV, seguito da PNRSV (Fig. 2). È interessante evidenziare che PNRSV era presente in un minore numero di piante, ma mostrava una maggiore diffusione ritrovandolo in entrambe le categorie considerate e in tutte le cultivar. Nessun altro virus tra quelli saggiati per queste specie è stato riscontrato.

Nel caso del fico cv. Dottato, constatata l'elevata diffusione in estate di foglie con un quadro sintomatico associabile a FMV, si è proceduto con il prelievo di campioni fogliari sintomatici e asintomatici per ogni singola pianta. Le analisi condotte hanno rilevato la presenza di FMV anche in alcuni campioni asintomatici. Questo risultato ha permesso di comprendere come la differenza tra i dati invernali ottenuti (nessun positivo) e quelli estivi (tutti positivi) siano probabilmente dovuti a una diversa presenza e/o a un differente titolo virale nelle diverse porzioni di ogni singola pianta nel momento del prelievo del materiale vegetale saggiato.

Tab. 4. Risultati delle analisi fitovirologiche (campioni positivi e virus individuati) nelle varietà arboree antiche selezionate all'interno del Progetto AMARCORT.

| Specie | Cultivar | Positivi inverno | Virus inverno | Positivi estate | Virus estate |
|---------------|-----------------------|------------------------|----------------|------------------------|-----------------------|
| Albicocco | Ammiraglia | 4/4 | PNRSV | - | - |
| Albicocco | Maharani | 4/4 | PNRSV | - | - |
| Fico | Dottato | 0/3 | - | 15/15 | FMV |
| Noce | Nocione del Casentino | 1/2 | CLRV | - | - |
| Melo | Mora | 3/3 | ACLSV | 15/15 | ACLSV; PNRSV |
| Melo | Rugginosa | 3/3 | ACLSV | 14/15 | ACLSV; PNRSV |
| Melo | Chitignano | 0/3 | - | 11/15 | PNRSV |
| Susino | Coscia di Monaca | 3/3 | PBNPaV; PPV | 12/15 | PBNPaV; PNRSV; PPV |
| Totale | | 18/25 (72%) | | 67/75 (89%) | |

Le indagini fitopatologiche e biochimiche hanno mostrato nel fico cv. Dottato, in foglie sintomatiche/positive, alterazione del processo fotosintetico probabilmente dovute a limitazioni stomatiche e mesofilliche (Fig. 3). Inoltre, sono stati osservati riduzioni dei valori dello SPAD sia in campioni asintomatici/positivi che in campioni sintomatici/positivi al virus (Fig. 4). Non è invece stata osservata alterazione dello stato idrico nella pianta (Fig. 5).

Nel caso del susino cv. Coscia di Monaca le indagini hanno mostrato nuovamente alterazioni del processo fotosintetico, a carico sempre di limitazioni a livello stomatico e mesofillico, e riduzione dello SPAD (Fig. 6 e Fig. 7). Quest'ultima imputabile a variazioni del contenuto dei pigmenti coinvolti nel ciclo delle xantofille (Fig.7). Inoltre, è stata osservata anche alterazione del potenziale idrico (Fig. 8). I campioni co-infetti da PBNPaV e PPV sono risultati quelli maggiormente

soggetti a queste variazioni già osservabili, in entità minore, in piante caratterizzate da singole infezioni.

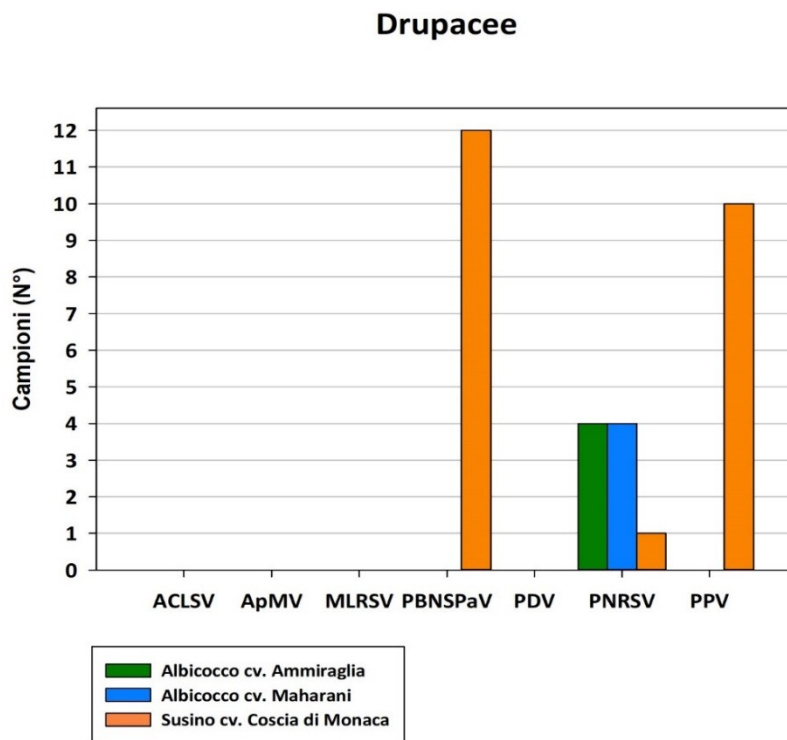


Fig. 1. Presenza dei virus saggiati all'interno del gruppo delle drupacee.

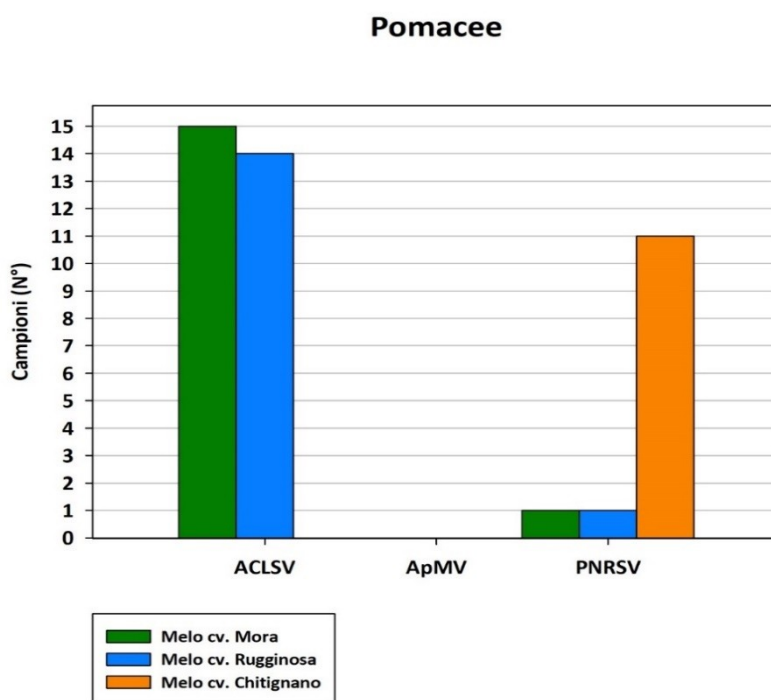


Fig. 2. Presenza dei virus saggiati all'interno del gruppo delle pomacee.

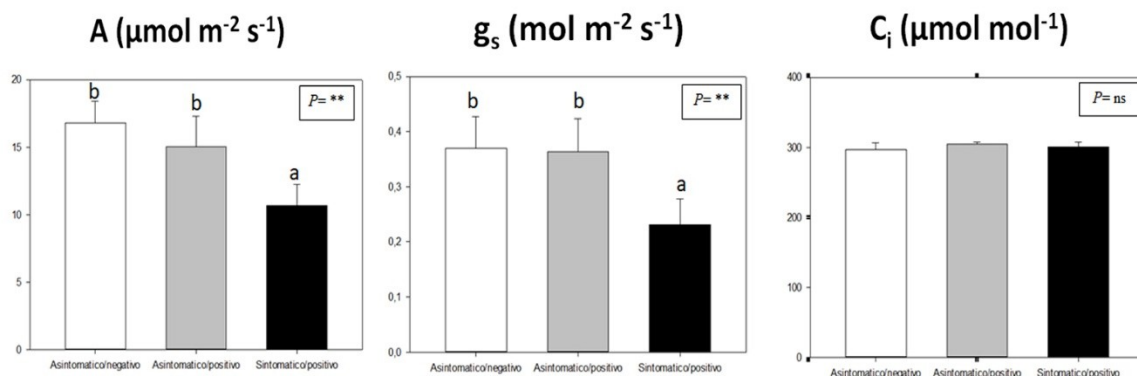


Fig. 3. Risultati delle indagini fisiopatologiche condotte su piante di fico cv. Dottato infetto da FMV per le tre condizioni valutate (asintomatico/negativo; asintomatico/positivo; sintomatico/positivo) considerando gli scambi gassosi (A , g_s , C_i).

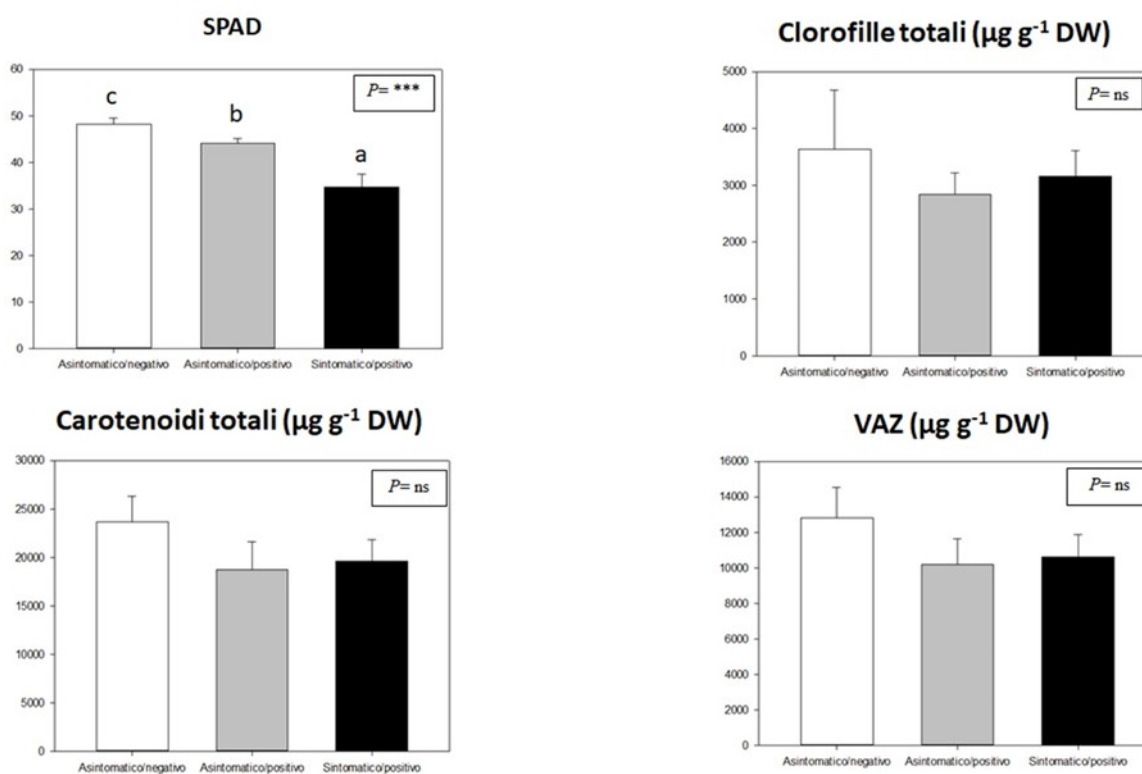


Fig. 4. Risultati delle indagini fisiopatologiche e biochimiche condotte su piante di fico cv. Dottato infetto da FMV per le tre condizioni valutate (asintomatico/negativo; asintomatico/positivo; sintomatico/positivo) considerando il contenuto di clorofille (SPAD) e i pigmenti fogliari (clorofille, carotenoidi e xantofille).

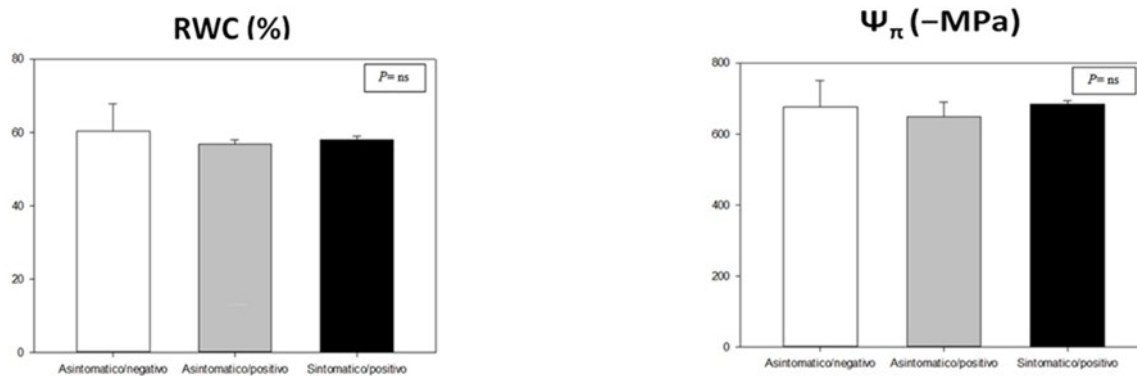


Fig. 5. Risultati delle indagini fisiopatologiche condotte su piante di fico cv. Dottato infetto da FMV per le tre condizioni valutate (asintomatico/negativo; asintomatico/positivo; sintomatico/positivo) considerando il contenuto relativo di acqua (RWC) e la pressione osmotica (Ψ_{π}).

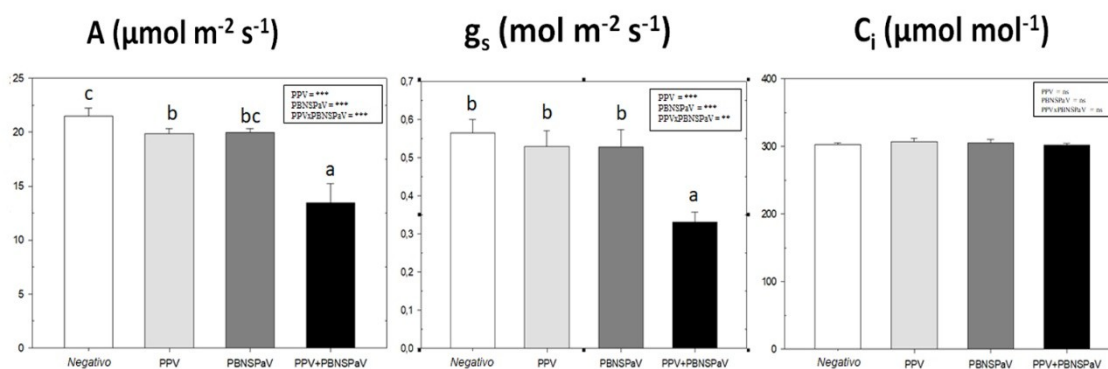


Fig. 6. Risultati delle indagini fisiopatologiche condotte su piante di susino cv. Coscia di Monaca infetto da PBNSPaV e PPV per le quattro condizioni valutate (negativo; positivo PPV; positivo PBNSPaV; positivo PPV×PBNSPaV) considerando gli scambi gassosi (A, g_s, C_i).

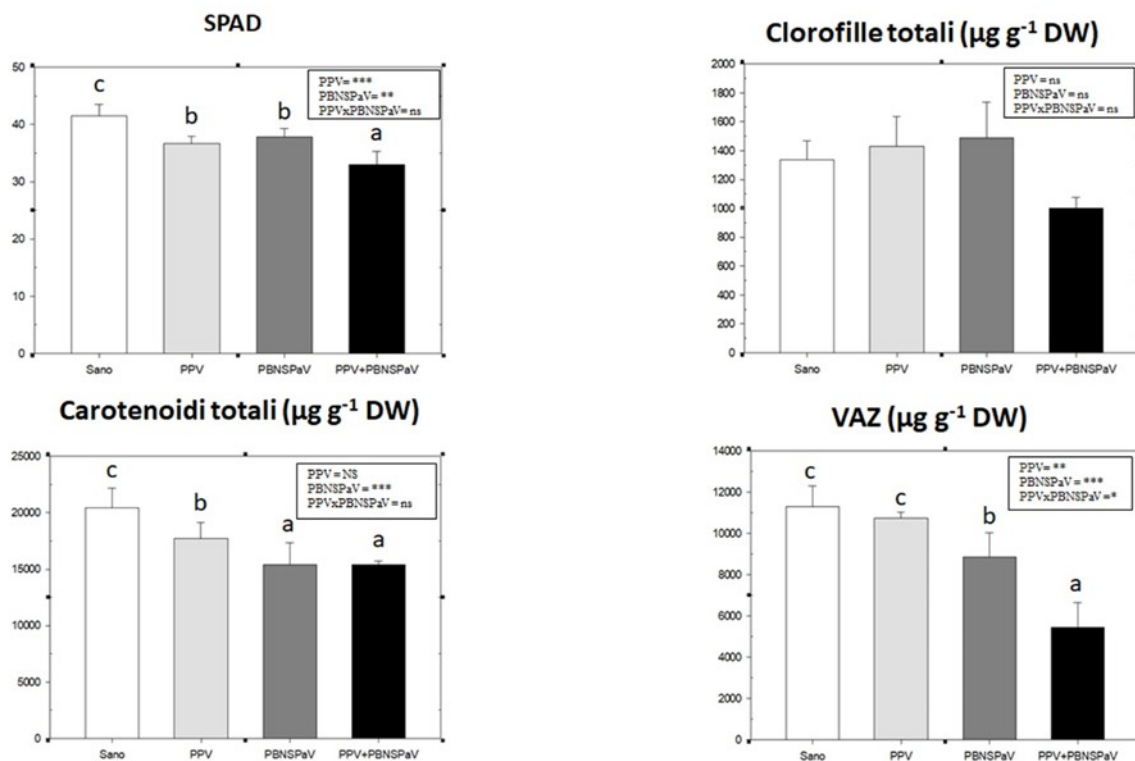


Fig. 7. Risultati delle indagini fisiopatologiche e biochimiche condotte su piante di susino cv. Coscia di Monaca infetto da PBNSPaV e PPV per le quattro condizioni valutate (negativo; positivo PPV; positivo PBNSPaV; positivo PPV×PBNSPaV) considerando il contenuto di clorofille (SPAD) e i pigmenti fogliari (carotenoidi, clorofille e xantofille).

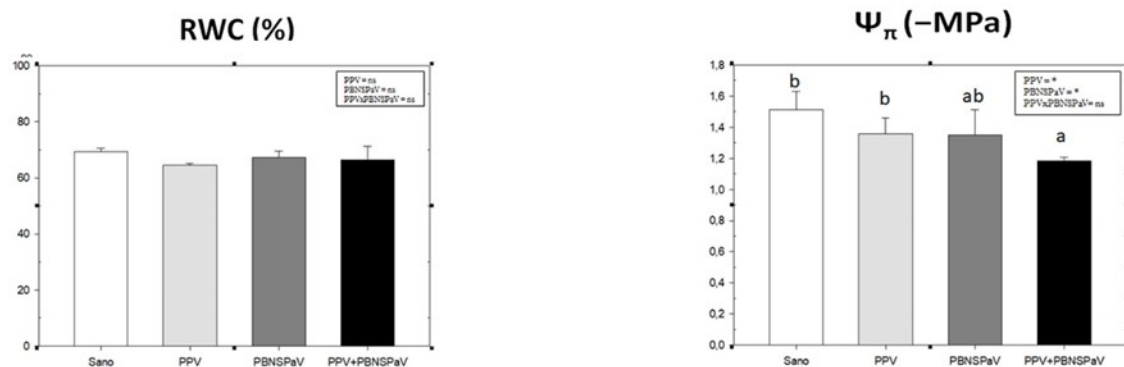


Fig. 8. Risultati delle indagini fisiopatologiche condotte su piante di susino cv. Coscia di Monaca infetto da PBNSPaV e PPV per le quattro condizioni valutate (negativo; positivo PPV; positivo PBNSPaV; positivo PPV×PBNSPaV) considerando il contenuto relativo di acqua (RWC) e la pressione osmotica (Ψ_{π}).

Conclusioni

I dati ottenuti hanno mostrato come il germoplasma antico toscano sia caratterizzato da una elevata presenza di virus. Questa evidenza risulta in accordo con studi precedentemente condotti su cultivar antiche, non solo in Toscana (Rizzo et al., 2010, Kamenova e Borisova, 2019; Tamara et al., 2022). Inoltre, le indagini di natura fisiopatologica e biochimica hanno mostrato come le infezioni virali vadano ad alterare il processo fotosintetico e lo stato idrico delle piante incidendo sullo sviluppo delle stesse.

Viene quindi confermato come la presenza dei virus sia un pericolo per le colture considerati i danni che possono arrecare sia a livello di fitness della pianta, sia in termini quantitativi che qualitativi alle produzioni.

La valutazione dello stato fitosanitario delle piante madri a inizio della filiera moltiplicativa e i monitoraggi in pieno campo risultano fondamentali in termini di prevenzione e di contenimento della diffusione dei virus considerando che, a livello globale, le perdite economiche associate a questi patogeni sono state stimate in 30 miliardi di dollari l'anno e che rappresentano circa il 50% degli agenti eziologici responsabili di malattie su specie vegetali (Hilaire et al., 2022). Nel caso delle varietà antiche, potrebbe essere ipotizzato e intrapreso un percorso di risanamento in laboratorio (malgrado le tempistiche di anni), non solo per scopi commerciali, ma anche in un'ottica di conservazione della biodiversità e di tutela del patrimonio sociale e storico-culturale del loro territorio di origine. Al fine di approfondire ulteriormente le conoscenze relative all'interazione tra le varietà antiche e i virus che ospitano, sono in corso ulteriori analisi fisiopatologiche.

Bibliografia

- Al Rwahnih M., Uyemoto J. K., Falk B. W., Rowhani A. (2007)** Molecular characterization and detection of plum bark necrosis stem pitting-associated virus. *Archives of Virology* **152**: 2197-2206.
- Decreto Legislativo 2 febbraio 2021, n. 18 (2021)** Norme per la produzione e la commercializzazione dei materiali di moltiplicazione e delle piante da frutto e delle ortive in attuazione dell'articolo 11 della legge 4 ottobre 2019, n. 117, per l'adeguamento della normativa nazionale alle disposizioni del regolamento (UE) 2016/2031 e del regolamento (UE) 2017/625. *Gazzetta ufficiale delle Repubblica italiana* **47- Supplemento ordinario n. 14/L**.
- Elbeaino T., Digiario M., Alabdullah A., De Stradis A., Minafra A., Mielke N., Castellano M. A. Martelli G. P. (2009)** A multipartite single-stranded negative-sense RNA virus is the putative agent of fig mosaic disease. *Journal of General Virology* **90**: 1281-1288.
- Hilaire J., Tindale S., Jones G. et al. (2022)** Risk perception associated with an emerging agri-food risk in Europe: plant viruses in agriculture. *Agriculture & Food Security* **11**: 21.
- Kamenova I., Borisova A. (2019)** Update on distribution and genetic variability of *Plum pox virus* strains in Bulgaria. *Plant Pathology Journal* **35**: 243-256.
- Kim, B. T., Gibson, P. G., Scott, S. W. (2010)** Expression of the coat protein genes of PNRSV and PDV in the synergistic disease peach stunt-21st International Conference on Virus and other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops. *Julius-Kühn-Archives* **427**: 114-117.
- Li R., Mock R., Huang Q., Abad J., Hartung J., Kinard G. (2008)** A reliable and inexpensive method of nucleic acid extraction for the PCR-based detection of diverse plant pathogens. *Journal of Virological Methods* **154**: 48-55.
- Menzel W., Jelkmann W., Maiss E. (2002)** Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control. *Journal of Virological Methods* **99**: 81-92.

- Olmos A., Bertolini E., Maite G., Cambra M. (2005)** Real-time assay for quantitative detection of non-persistently transmitted *Plum pox virus* RNA targets in single aphids. *Journal of Virological Methods* **128**: 151-155.
- Osman F., Al Rwahnih M., Rowhani A. (2017)** Real-time RT-qPCR detection of *Cherry rasp leaf virus*, *Cherry green ring mottle virus*, *Cherry necrotic rusty mottle virus*, *Cherry virus a* and *Apple chlorotic leaf spot virus* in stone fruits. *Journal of Plant Pathology* **99**: 279-285.
- Rizzo D., Stefani L., Paoli M., Della Bartola M., Materazzi A. (2010)** Phytosanitary survey on pome fruit autochthon germplasm in Tuscany. *Servizio Fitosanitario Regione Toscana*. Poster. XVII Convegno nazionale SIPAV.
- Stanton K. M. and Mickelbart M. (2014)** Maintenance of water uptake and reduced water loss contribute to water stress tolerance of *Spiraea alba* Du Roi and *Spiraea tomentosa* L. *Horticulture Research* **1**:14033.
- Tamara D. C., Stone A. L., Sherman J. D., Damsteegt D. V., Schneider W. L., Rogers E. E (2022)** Viral reservoir capacity of wild *Prunus* alternative hosts of *Plum pox virus* through multiple cycles of transmission and dormancy. *Plant Disease* **106**: 101-106.
- Tiekstra A. E., Else M. A., Jakson M.B. (2000)** External Pressures Based on Leaf Water Potentials Do Not Induce Xylem Sap to Flow at Rates of Whole Plant Transpiration from Roots of Flooded or Well-drained Tomato and Maize Plants. Impact of Shoot Hydraulic Resistances. *Annals of Botany* **86**:665-674.
- Werner R., Mühlbach H.P., Büttner C. (1997)** Detection of Cherry leaf roll nepovirus (CLRV) in birch, beech and petunia by immuno-capture RT-PCR using a conserved primer pair. *European Journal of Forest Pathology* **27**: 309-318.