



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN: SCIENZE FORESTALI ED AMBIENTALI

**IDENTIFICAZIONE DEL FITOPLASMA
ASSOCIATO AGLI SCOPAZZI DELLA
GINESTRA NELLA REGIONE MARCHE**

TIPO TESI: sperimentale

Studente:
FRANCESCA PACIOCCO

Relatore:
PROF. SERGIO MUROLO

ANNO ACCADEMICO 2020-2021

Dedico questo lavoro alla ricerca scientifica ed alla Natura, mia più grande maestra.

INDICE

ELENCO DELLE TABELLE	4
ELENCO DELLE FIGURE	5
ACRONIMI E ABBREVIAZIONI	6
ABSTRACT	7-8
CAPITOLO 1: INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI	9
1.1 Generalità su <i>Spartium junceum L.</i>	9
1.2 Fitoplasmi	12
1.2.1 <i>Caratteristiche generali sui fitoplasmi</i>	12
1.2.2 <i>Sistematica</i>	14
1.2.3 <i>Trasmissione</i>	16
1.2.3.1 <i>Trasmissione tramite insetto vettore</i>	16
1.3 Scopo della tesi	18
CAPITOLO 2: MATERIALI E METODI	19
2.1 Raccolta dei campioni	19
2.2 Estrazione del DNA	20
2.3 Amplificazione genica	23
2.4 Visualizzazione con elettroforesi	27
CAPITOLO 3: RISULTATI	30
3.1 Osservazione dei sintomi	30
CAPITOLO 4: DISCUSSIONE	38
CONCLUSIONI	40
BIBLIOGRAFIA	41
RINGRAZIAMENTI	47

ELENCO DELLE TABELLE

Tabella 1: Specie di Candidatus Phytoplasma.....	pag. 15
Tabella 2: Siti censiti e provenienza dei campioni analizzati.....	pag.19
Tabella 3: Reagenti con le relative quantità per l'amplificazione.....	pag.24
Tabella 4: Sequenze di primer universali per fitoplasmi.....	pag.25
Tabella 5: Descrizione dei cicli di amplificazione.....	pag. 26
Tabella 6: Sintomatologia e risultati diagnosi molecolare.....	pag. 36

ELENCO DELLE FIGURE

Figura 1: <i>Spartium junceum</i>	pag.9
Figura 2: <i>Spartium junceum</i> nel suo habitat.....	pag.11
Figura 3: Fitoplasmi visti al microscopio	pag.12
Figura 4: Principali sintomi indotti dai fitoplasmi.....	pag.13
Figura 5: Ciclo di trasmissione della fitoplasmosi tramite insetto vettore.....	pag.17
Figura 6: Ramificazione sintomatica.....	pag.20
Figura 7: Processo protocollo CTAB.....	pag.21
Figura 8: Incubazione tramite bagno di acqua calda.....	pag.21
Figura 9: Campioni in centrifuga.....	pag.22
Figura 10: Eppendorf durante asciugatura.....	pag.23
Figura 11: Campioni per la nested PCR.....	pag.25
Figura 12: Impostazione dei cicli di amplificazione sul termociclatore.....	pag.26
Figura 13: Cella elettroforetica e transilluminatore	pag.28
Figura 14: Cespugli di ginestra con anomalie nello sviluppo vegetativo.....	pag.30
Figura 15: Deformazioni dovute all'alterazione del. Metabolismo	pag.31
Figura 16: Fascinazione dei fusti	pag.32
Figura 17: Fillodia.....	pag.33
Figura 18: Disseccamento.....	pag.34
Figura 19: Marker rossi indicanti luoghi di ritrovamento.....	pag 34
Figura 20: Gel di agarosio su cui sono stati caricati i campioni.....	pag. 35
Figura 21: Cromatogramma della sequenza ottenuta e risultati dell'analisi Blast.....	pag.38
Figura 22: Mappa generale zone focolai Regione Marche.....	pag.39

ACRONIMI E ABBREVIAZIONI

SPA-WB: Spartium witches'-broom.

FD: Flavescenza dorata

ABSTRACT

Spanish broom (*Spartium junceum* L.) is a shrub known for its outstanding pioneer qualities, for its ability to adapt to difficult soil conditions and rather prolonged periods of dryness. For these reasons, *S. junceum* is widely distributed in Italian landscape in a variety of soil conditions, altitudes and temperature ranges. On the Marche Apennines up to the Conero Riviera, it forms patches on escarpments and lowland areas, playing an important role in mitigating the erosion of steep slopes and in the recovery of degraded areas (quarries and landfills). Particularly evident and considerable beauty during flowering is Spanish broom, so much as to inspire in the past poems by the famous Marche poet Giacomo Leopardi. During the spring of 2019 and 2020, a monitoring was carried out in the Marche region, to assess the presence of *S. junceum* bushes showing symptoms associated with phytoplasma infections. The main symptoms were the “witches’ broom” and “branch fasciation”. Witches’ broom give to the plant a compacted appearance and are accompanied by a light green color tending to yellowing, which can turn into drying of even extended portions of the plant. The other less common symptom, but still present on some monitored plants, is the branch fasciation. Symptomatic plants, sporadic in 2019, were recorded more frequently in 2020, mainly in location near the coast. From 52 symptomatic and 12 symptomless plants, we collected few branches, which were subjected to DNA extraction and to amplification with universal primers P1/P7, followed in nested PCR with R16F2n/R2. All the symptomatic plants resulted positive to phytoplasma infection, while for asymptomatic plants and water control we did not yield any amplicon. Representative amplicons were purified and sequenced. From blast analysis, the samples showed a high homology (100%) with the reference nucleotide sequence MT629815, detected in *Livilla spectabilis*, reported to be the potential vector of SpaWB-associated phytoplasma, and MT629806, detected in the isolate Sj2MS of *Spartium junceum*. Spanish broom was identified as a reservoir and potential inoculum source of phytoplasma, that can cause severe disease in other crops. The recording of several infected plants of *S. junceum* can induce to hypothesize the active presence of vectors and a potential effect on the regional landscape.

RIASSUNTO

La ginestra (*Spartium junceum* L.) è un arbusto noto per le sue spiccate qualità pioniere, per la sua capacità di adattamento a condizioni pedologiche difficili e periodi di siccità piuttosto prolungati. Per questi motivi *S. junceum* è ampiamente distribuito nel paesaggio italiano in una varietà di condizioni pedologiche, altitudini e temperature. Sull'Appennino marchigiano fino alla Riviera del Conero forma macchie su scarpate e zone di pianura, svolgendo un ruolo importante nella mitigazione dell'erosione dei ripidi pendii e nel recupero di aree degradate (cave e discariche). È particolarmente evidente e di notevole bellezza durante la fioritura, tanto da ispirare in passato poesie del famoso poeta marchigiano Giacomo Leopardi. Nella primavera del 2019 e del 2020 è stato effettuato un monitoraggio nella regione Marche, per valutare la presenza di arbusti di *S. junceum* che mostravano sintomi associati a infezioni da fitoplasmi. I sintomi principali erano "scopazzi" e "fascinazione". Gli scopazzi conferiscono alla pianta un aspetto compattato e sono accompagnate da un colore verde chiaro tendente al giallo, che può trasformarsi in essiccamento anche di grosse porzioni della pianta. L'altro sintomo meno comune, ma ancora presente su alcune piante monitorate, è la fascinazione dei rami. Piante sintomatiche, sporadiche nel 2019, sono state registrate più frequentemente nel 2020, principalmente in località vicino alla costa. Da 52 piante sintomatiche e 12 asintomatiche, abbiamo raccolto alcuni rami, che sono stati sottoposti a estrazione e amplificazione del DNA con primer universali P1 / P7, seguiti da nested PCR con R16F2n / R2. Tutte le piante sintomatiche sono risultate positive all'infezione da fitoplasmi, mentre per le piante asintomatiche e il controllo dell'acqua non abbiamo prodotto ampliconi. Gli ampliconi rappresentativi sono stati purificati e sequenziati. Dall'analisi blastica, i campioni hanno mostrato un'elevata omologia (100%) con la sequenza nucleotidica di riferimento MT629815, rilevata in *Livilla spectabilis*, riportata come potenziale vettore del fitoplasma associato a SpaWB, e MT629806, rilevata nell'isolato Sj2MS di *Spartium junceum*. La ginestra spagnola è stata identificata come serbatoio e potenziale fonte di inoculo di fitoplasmi, che può causare gravi malattie in altre colture. La registrazione di numerose piante infette da *S. junceum* può far ipotizzare la presenza attiva di vettori e un potenziale effetto sul paesaggio regionale.

CAPITOLO 1

INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI

1.1. Generalità su *Spartium junceum* L.

Spartium junceum L. (Ginestra odorosa), appartenente alla famiglia delle *Fabaceae*, è una pianta arbustiva alta 50-200 (400) cm, con fusto eretto o ascendente, cilindrico, fibroso, tenace, cavo, di colore verde, molto ramificato e con numerosi getti nuovi alla base (Fig. 1A). Le foglie sono semplici, sessili o brevemente picciolate, rade e distanziate sul caule, lunghe 1-3 cm, con margine intero, glabre, di colore verde scuro, sericee nella pagina inferiore, presto caduche tanto che sono quasi scomparse alla fioritura. I fiori profumati, ermafroditi, papilionacei, sono di un bel colore giallo vivo, hanno il calice lungo 4 mm, membranoso, persistente, quasi interamente saldato e diviso con un taglio obliquo fino alla base in un solo labbro terminante con 5 piccoli denti.



Figura 1: Spartium junceum.

Il frutto è un legume falcefornne, oblungo, eretto, sericeo, compresso, verde e vellutato (Fig. 1B), poi glabro e nerastro alla maturazione, quando deisce con una torsione ed espelle lontano i suoi 10-18 semi bruni, lucenti e velenosi (Pignatti, 1982; Conti et al., 2005; Ansaldo et al., 1994; Lanzara, 1997).

La ginestra è caratterizzata da elevata adattabilità a varie condizioni ambientali e pedoclimatiche (Bezic et al., 2003), è particolarmente tollerante a condizioni di siccità gravi. Cresce spontaneamente su terreni rocciosi e su ripidi pendii vicino al mare. Oltre ai suoi adattamenti xeromorfici, si è anche adattato a concentrazioni di sale più elevate nel suolo. Per la sua elevata capacità di adattamento, la ginestra è ampiamente distribuita in Italia in una varietà di condizioni pedologiche, altitudini e escursioni termiche.

La ginestra è tipica della macchia mediterranea, specie delle zone temperato-calde (Pignatti, 1982). In Italia, è uniformemente distribuita su tutto il territorio. Sopporta i forti venti, ma in presenza di questi la crescita rallenta e la pianta diventa più compatta. Cresce bene lungo le coste e sopporta anche il vento salmastro. Il suo habitat è in luoghi aridi, radure, terreni pesanti preferibilmente di natura calcarea, ma da pianta pioniera, si adatta in ogni tipo di terreno (Fig. 2). Vegeta dal piano fino a 600 m s.l.m. sulle Alpi, ma raggiunge 1.400 m s.l.m. sugli Appennini (Biondi et al., 2010) e 2.000 m s.l.m. sull'Etna.

Spartium junceum, grazie alle sue caratteristiche riveste un ruolo cruciale nel miglioramento della stabilità dei versanti soprattutto in condizioni pedoclimatiche critiche e dove le pendenze sono piuttosto ripide (Preti and Giadrossich, 2009). Inoltre, è considerata una specie pioniera, in quanto è in grado di colonizzare gli strati lavici dopo le eruzioni. Si tratta di una pianta che, dopo aver colonizzato e migliorato i terreni nudi o degradati, lascia spazio ad altre specie, che altrimenti da sole non riuscirebbero a svilupparsi. Ha quindi un'importante funzione in ambito forestale. Per la sua rapida crescita e adattabilità, la ginestra ha però un impatto negativo sulla distribuzione delle specie vegetali autoctone. Una volta insediatasi, riesce a formare popolamenti densi e monospecifici che competono e sostituiscono le specie autoctone. Per tale ragione, la ginestra spagnola originaria dell'Europa meridionale e dell'area mediterranea è elencata come specie invasiva negli Stati Uniti, in Sud America e in Sud Africa (Gavilàn et al., 2016; CABI, 2019).



Figura 2: Spartium junceum nel suo habitat.

1.2 Fitoplasmi

1.2.1. *Caratteristiche generali sui fitoplasmi*

I fitoplasmi sono fitopatogeni procarioti non coltivabili e privi di parete della classe Mollicutes, con una dimensione genomica che va da 530 a 1350 kb (Marcone et al., 1999) (Fig. 3).



Figura 3: Fitoplasmi visti al microscopio. Fonte: quora.com

I fitoplasmi sono dotati di membrana che delimita il citoplasma contenente ribosomi e DNA. Sono parassiti obbligati, vivono nei tubi floematici delle piante e nell'emolinfa degli insetti vettori, i quali sono i maggiori responsabili della loro trasmissione e diffusione. I fitoplasmi vengono trasmessi da pianta a pianta attraverso l'atto trofico (punture) di insetti appartenenti principalmente all'ordine degli *Hemiptera*.

Le specie vegetali in cui sono stati individuati sono distribuite in zone che vanno dalle regioni temperato-calde a quelle tropicali (McCoy et al., 1989; Seemuller et al., 1998; Bertaccini et al., 2019).



Figura 4: Principali sintomi indotti dai fitoplasmi. Fonti: giardini.biz, es.m.wikipedia.org, grapesrl.it, coltivarefacile.it.

I sintomi tipici (Fig. 4) di fitoplasmosi variano a seconda della specie vegetale ospite, generalmente si ha arresto o rallentamento della crescita con accorciamento degli internodi, perdita di dominanza apicale e conseguente aspetto cespuglioso derivante dallo sviluppo delle gemme laterali (scopazzi). Tali sintomi sono anche accompagnati da produzione di rosette fogliari, stipole ingrossate e allungate, malformazione dei frutti con ridotto sviluppo e cascola precoce. Un sintomo distintivo è l'ingiallimento fogliare (in alcuni casi le fitoplasmosi prendono anche il nome di "giallumi") (Marcone et al., 1996) ma anche colorazioni rosso violacee a seconda dei pigmenti prodotti dalla pianta ospite, nanismo, fillodia (trasformazione degli organi fiorali in foglie), alterazione del bioritmo legato alle stagioni (fioritura anticipata), alterazione dell'equilibrio ormonale, virescenza (sviluppo di fiori verdi) e in alcuni casi anche la morte della pianta (Lee et al., 2000).

1.2.2 Sistematica

I fitoplasmi sono un ampio gruppo di microrganismi privi di parete cellulare, associati a numerose malattie delle piante di importanza economica. Poiché i tentativi di coltivare regolarmente i fitoplasmi in terreni di coltura artificiali sono falliti, il loro studio e la loro classificazione sono più complessi. L'attuale classificazione dei fitoplasmi si basa in gran parte sulla sequenza del gene 16S rRNA. Si sta studiando il possibile uso di geni aggiuntivi per identificare e classificare meglio i fitoplasmi, poiché alcuni ceppi strettamente correlati sono attualmente difficili da distinguere utilizzando il solo gene che codifica per l'rRNA 16S.

Per il momento, i fitoplasmi sono classificati in 33 gruppi ribosomiali, ciascuno comprendente un numero di sottogruppi (ottenuti mediante analisi RFLP e/o RFLP virtuale dell'amplicone o sequenza del gene ribosomiale 16S con un numero di enzimi di restrizione). Per la maggior parte dei gruppi e sottogruppi è stato attribuito '*Candidatus Phytoplasma*'.

Il numero di nuove specie di "*Candidatus Phytoplasma*" e di gruppi e sottogruppi ribosomiali è in costante crescita e non è stato ancora possibile attribuire una identità "*Candidatus Phytoplasma*" a tutti i fitoplasmi studiati.

La tabella seguente (Bertaccini, 2019, Tab.1) mostra le "specie *Candidatus Phytoplasma*" attualmente proposte e i loro gruppi 16Sr - sottogruppi. Come spiegato sopra, a molti fitoplasmi non è stato attribuito un nome di specie "*Candidatus Phytoplasma*" ma sono classificati solo sulla base del loro gruppo e sottogruppo 16Sr (questi non sono mostrati nella tabella).

Tabella 1: Specie di *Candidatus Phytoplasma*.

16Sr group-subgroup	'<i>Candidatus Phytoplasma species</i>'	Associated disease
I-B	' <i>Ca. Phytoplasma asteris</i> '	Aster yellows
I-Y	' <i>Ca. Phytoplasma lycopersici</i> '	Tomato 'brote grande'
II-B	' <i>Ca. Phytoplasma aurantifolia</i> '	Lime witches' broom
II-D	' <i>Ca. Phytoplasma australasia</i> '	Papaya mosaic
III-A	' <i>Ca. Phytoplasma pruni</i> '	Peach X-disease
V-A	' <i>Ca. Phytoplasma ulmi</i> '	Elm yellows
V-B	' <i>Ca. Phytoplasma ziziphi</i> '	Jujube witches' broom
V-E	' <i>Ca. Phytoplasma rubi</i> '	Rubus stunt
V-F	' <i>Ca. Phytoplasma balanitae</i> '	Balanites witches' broom
VI-A	' <i>Ca. Phytoplasma trifolii</i> '	Clover proliferation
VI-I	' <i>Ca. Phytoplasma sudamericanum</i> '	Passionfruit witches' broom
VII-A	' <i>Ca. Phytoplasma fraxini</i> '	Ash yellows
VIII-A	' <i>Ca. Phytoplasma luffae</i> '	Loofah witches' broom
IX-B	' <i>Ca. Phytoplasma phoenicium</i> '	Almond witches' broom
X-A	' <i>Ca. Phytoplasma mali</i> '	Apple proliferation
X-B	' <i>Ca. Phytoplasma prunorum</i> '	European stone fruit yellows
X-C	' <i>Ca. Phytoplasma pyri</i> '	Pear decline
X-D	' <i>Ca. Phytoplasma spartii</i> '	Spartium witches' broom
XI-A	' <i>Ca. Phytoplasma oryzae</i> '	Rice yellow dwarf
XI-E	' <i>Ca. Phytoplasma cirsii</i> '	Cirsium phytoplasma
XII-A	' <i>Ca. Phytoplasma solani</i> '	Stolbur
XII-B	' <i>Ca. Phytoplasma australiense</i> '	Australian grapevine yellows
XII-D	' <i>Ca. Phytoplasma japonicum</i> '	Japanese hydrangea phyllody
XII-E	' <i>Ca. Phytoplasma fragariae</i> '	Strawberry yellows
XII-H	' <i>Ca. Phytoplasma convolvuli</i> '	Bindweed yellows
XIII-A	' <i>Ca. Phytoplasma hispanicum</i> '	Mexican periwinkle virescence
XIII-G	' <i>Ca. Phytoplasma meliae</i> '	Chinaberry yellowing
XIV-A	' <i>Ca. Phytoplasma cynodontis</i> '	Bermuda grass white leaf
XV-A	' <i>Ca. Phytoplasma brasiliense</i> '	Hibiscus witches' broom
XVI-A	' <i>Ca. Phytoplasma graminis</i> '	Sugarcane yellow leaf
XVII-A	' <i>Ca. Phytoplasma caricae</i> '	Papaya bunchy top
XVIII-A	' <i>Ca. Phytoplasma americanum</i> '	American potato purple top wilt
XIX-A	' <i>Ca. Phytoplasma castaneae</i> '	Chestnut witches' broom
XX-A	' <i>Ca. Phytoplasma rhamni</i> '	Rhamnus witches' broom
XXI-A	' <i>Ca. Phytoplasma pini</i> '	Pinus phytoplasma

16Sr group-subgroup	' <i>Candidatus Phytoplasma species</i> '	Associated disease
XXII-A	' <i>Ca. Phytoplasma palmicola</i> '	Lethal yellowing
XXIX-A	' <i>Ca. Phytoplasma omanense</i> '	Cassia witches' broom
XXX-A	' <i>Ca. Phytoplasma tamaricis</i> '	Salt cedar witches' broom
XXXI-A	' <i>Ca. Phytoplasma costaricanum</i> '	Soybean stunt
XXXII-A	' <i>Ca. Phytoplasma malaysianum</i> '	Malaysian periwinkle virescence
XXXIII-A	' <i>Ca. Phytoplasma allocasuarinae</i> '	Allocasuarina phytoplasma
XXXVI-A	' <i>Ca. Phytoplasma wodyetiae</i> '	Foxtail palm phytoplasma
-	' <i>Ca. Phytoplasma noviguineense</i> '	Bogia coconut syndrome

1.2.3 *Trasmissione*

1.2.3.1 *Trasmissione tramite insetto vettore*

La trasmissione dei fitoplasmi può avvenire tramite insetti vettori, piante parassite, tecniche di propagazione vegetativa e attraverso il seme.

La trasmissione attraverso gli insetti vettori, definita di tipo persistente-propagativo (Fig. 5) è caratterizzata dalle seguenti fasi:

- *Acquisizione*: si realizza mediante le punture trofiche su piante infette; il tempo di nutrizione necessario varia da 2 a 4 giorni e la capacità di acquisizione da parte dell'insetto è più elevata nelle forme giovanili. Inoltre, è possibile anche la trasmissione transovarica da femmine infette alla prole. L'acquisizione di un fitoplasma da parte di un insetto vettore è condizionata da molti fattori biologici come la specie, il biotipo, l'età e il sesso, dalle caratteristiche delle piante sorgente di inoculo, ma anche da fattori ambientali come la temperatura, l'umidità e il fotoperiodo. (Alma et al., 1997; Tedeschi et al., 2006).
- *Latenza*: avviene la moltiplicazione del fitoplasma e la sua diffusione nelle cellule parietali del mesentero dell'insetto, quindi nell'emolinfa poi in organi come tubi malpighiani, ovario e passaggio nelle ghiandole salivari.
- *Inoculazione*: quando la concentrazione delle cellule del fitoplasma ha raggiunto certi livelli nelle ghiandole salivari, l'insetto è in grado di trasmetterlo a nuove piante.

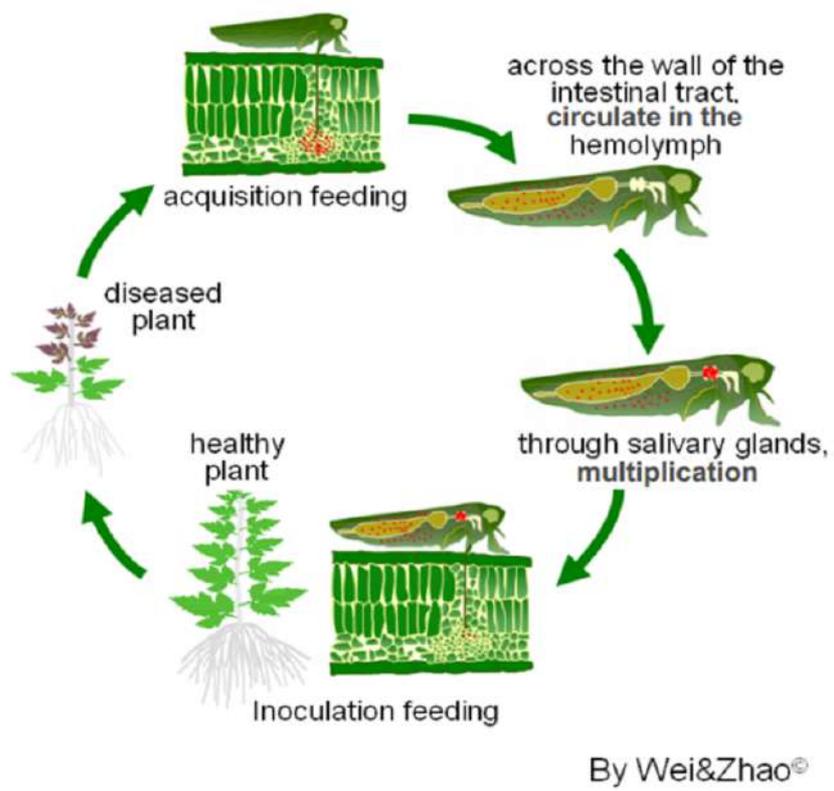


Figura 5: Trasmissione dei fitoplasmi tramite insetto vettore.

1.3 Scopo della tesi

La ginestra è un arbusto che caratterizza il paesaggio delle Marche e di tutto l'Appennino, rivestendo un ruolo ecologico molto importante. Essendo una leguminosa, cresce fissando direttamente l'azoto atmosferico, ha un effetto stabilizzante sui pendii e sui fianchi delle valli e fornisce un contributo alla protezione del suolo dall'erosione, inoltre è una pianta pioniera in grado di crescere in condizioni ambientali e pedoclimatiche anche molto differenti.

Considerando l'importanza paesaggistica ed ecologica della ginestra, si è ritenuto opportuno indagare sullo stato fitosanitario di *Spartium junceum* partendo dall'osservazione di anomalie riscontrate nello sviluppo vegetativo, descritte in bibliografia come "scopazzi". Tale sintomatologia è in genere associata a infezioni da fitoplasmi, per cui l'obiettivo della presente ricerca è stato quello di identificare l'agente patogeno.

La ricerca è stata svolta inizialmente cercando in letteratura i siti nella regione Marche in cui *Spartium junceum* era stata segnalata, successivamente sono stati effettuati sopralluoghi durante i quali sono stati raccolti campioni sia da piante sintomatiche che mostravano "scopazzi" che da piante asintomatiche. Dai campioni è stato estratto il DNA totale, successivamente sottoposto ad analisi molecolare (amplificazione genica e sequenziamento).

CAPITOLO 2

MATERIALI E METODI

2.1 Raccolta dei campioni

Prima di iniziare con l'attività di raccolta dei campioni e programmare sopralluoghi mirati, è stata consultata la bibliografia ed in particolare il lavoro svolto da Biondi et al. (2010), in cui venivano descritti gli areali della ginestra e in particolare la presenza nella regione Marche. Sulla base di questi dati, sono stati effettuati tra maggio e ottobre del 2020 nella regione Marche diversi sopralluoghi per monitorare la presenza di *Spartium junceum* e verificarne lo stato fitosanitario (Tab. 2).

Tabella 2: Siti censiti e provenienza dei campioni raccolti e analizzati.

Siti censiti	Città/Provincia/Regione	n. campioni
Parco del Cardeto	Ancona, AN, Marche.	20
Tavernelle	Ancona, AN, Marche.	13
Campus Agraria	Ancona, AN, Marche.	3
Numana	Numana, AN, Marche.	5
Sirolo	Sirolo, AN, Marche.	3
Val di Castro	Fabriano, AN, Marche.	10
Acquasanta terme	Acq. Terme, AP, Marche.	3
Abetito	Montegallo, AP, Marche.	5
Amandola	Amandola, FM, Marche.	3
Totale		65

2.2 Estrazione del DNA

I 65 campioni sono stati sottoposti all'estrazione del DNA totale seguendo il protocollo proposto da Murolo et al. (2014), che essendo specifico per campioni di vite, ha subito piccole modificazioni per renderlo maggiormente efficiente per piante di ginestra. Di seguito si riportano le principali fasi del processo di estrazione:

- 1) All'interno di mortai sterili è stata aggiunta una spatola (50 mg) di metabisolfito di sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) con funzione di antiossidante e 3 ml di CTAB al 3%.

Per ogni pianta campionata sono state selezionate le ramificazioni erbacee con sintomi di scopazzi, quando presenti (Fig. 6), sminuzzandone circa 0.5 g.



Figura 6: Ramificazione sintomatica.

Particolarmente importante la sterilizzazione degli arnesi e del piano di lavoro tra un campione e l'altro con ipoclorito di sodio al 5% ed alcool, per evitare le contaminazioni.

- 2) Le parti vegetali sminuzzate presenti nel mortaio, sono state omogenizzate e il succo verde è stato versato in due eppendorf da 2 ml, filtrando il composto con il pestello in modo da trattenere le parti vegetali più grossolane (Fig. 7). Le provette riempite e siglate con nome abbreviato della pianta e numero di campione, finché non verrà iniziato il lavoro di estrazione vero e proprio,

saranno conservate in congelatore alla temperatura di -20°C onde evitare la degradazione dell'estratto.



Figura 7: Processo protocollo CTAB.

- 3) I campioni sono stati incubati tramite un bagno di acqua calda (Fig. 8), sorretti da un porta-epENDORF galleggiante alla temperatura di 65°C per circa 30 min, capovolgendoli ogni 5 min, per facilitare il processo di estrazione. Successivamente, sono stati posti in frigorifero a 4°C per dieci minuti.



Figura 8: Incubazione tramite bagno di acqua calda.

La sospensione nelle eppendorf, raffreddata, è stata agitata su vortex alla massima velocità per qualche minuto e in seguito posta in centrifuga per 10 minuti a 8.000 rpm, alla temperatura di 10°C.

- 4) Un'aliquota di 900 μL di surnatante è stata trasferita in provette da 2 mL (stando attenti a non toccare i sedimenti sottostanti) a cui è stato aggiunto un ugual volume di cloroformio, che ha la funzione di denaturare le proteine, che, in seguito, andranno incontro a precipitazione. Le provette sono state messe ad agitare energicamente per qualche minuto tramite l'utilizzo del vortex e per poi essere centrifugate a 12.000 rpm per dieci minuti a 10° C.
- 5) Sempre sotto cappa chimica, è stata prelevata un'aliquota di 700 μL del surnatante che è stato trasferito in provette da 1.5 mL, aggiungendo isopropanolo freddo nella proporzione di 1:1 (per 700 μL di surnatante, 700 μL di isopropanolo) per far avvenire la precipitazione degli acidi nucleici. Dopo aver agitato delicatamente le provette, queste sono state conservate in frigorifero alla temperatura di 4°C per dieci minuti e infine sono state messe in centrifuga (Fig. 9) per 25 minuti a 13.000 rpm.



Figura 9: Campioni in centrifuga.

- 6) Le provette sono state svuotate, e il pellet (acidi nucleici precipitati) depositato sul fondo è stato lavato con 400 μL di etanolo al 70%, per purificarlo da eventuali sali residui. Le eppendorf, poste in centrifuga per dieci minuti alla velocità di 13.000 rpm, sono state svuotate delicatamente, lasciate ad asciugare capovolte su della carta assorbente per eliminare gli eccessi di etanolo (Fig. 10).
- 7) Il pellet presente in ciascuna delle provette è stato sospeso in 60 μL di H_2O sterile e conservate in frigo a 4°C in attesa di essere processato.
- 8) È stata valutata la qualità e la quantità degli acidi nucleici estratti. È stato utilizzato un biofotometro che ha permesso di verificare il rapporto 260/280, 260/230 per avere un'idea della qualità del DNA estratto, e la concentrazione per microlitro.

A questo punto i campioni sono pronti per l'analisi PCR. Se la reazione a catena della polimerasi non dovesse essere eseguita subito, conservare i campioni a -20°C.

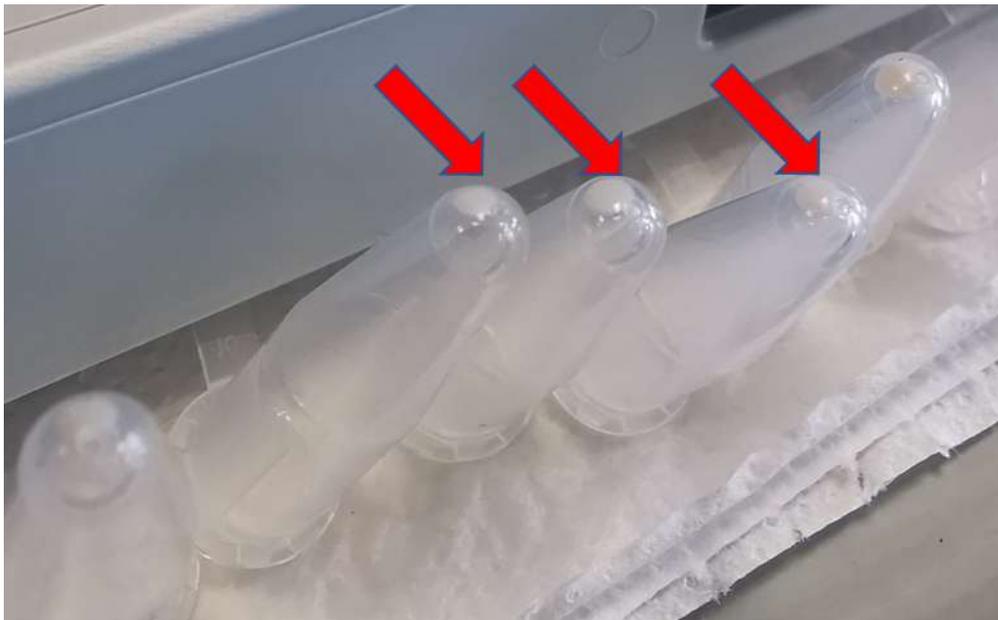


Figura 10: Eppendorf capovolti durante le fasi di drenaggio per facilitare l'asciugatura dei pellet, indicati dalle frecce rosse.

2.3 Amplificazione genica (PCR)

La reazione di PCR nota come amplificazione genica, è un metodo di individuazione di porzione di acidi nucleici molto sensibile (Chen et al., 1993) che permette di evidenziare la presenza di fitoplasmi anche quando si trovano a basse concentrazioni all'interno del floema. Questa metodologia permette di produrre, in un tempo relativamente breve, un elevatissimo numero di molecole di acido nucleico identiche tra loro e alla molecola di partenza, che funge da stampo per la replicazione.

Perché tale reazione avvenga, l'enzima polimerasi deve avere a disposizione una miscela di DNA denaturato, a singola elica, ottenuto mediante innalzamento della temperatura a 94°C. Dopo la denaturazione del DNA a doppia elica, l'innesco della reazione è rappresentato da una coppia di oligonucleotidi sintetici detti "primer", i quali si appaiono ("annealing") per omologia alle molecole di DNA bersaglio ("template"). I nucleotidi trifosfati d-ATP, d- GTP, d-CTP e dTTP, sono necessari nella miscela di reazione per la sintesi di nuovo DNA, infine precise condizioni chimico-fisiche favoriscono l'amplificazione. L'aumento esponenziale del quantitativo di molecole di DNA è possibile grazie alla ripetizione ciclica delle fasi di denaturazione del DNA stampo, di "annealing" degli oligonucleotidi al "template" e di allungamento o sintesi della catena nucleotidica ad opera della DNA polimerasi. Le reazioni di amplificazione sono state condotte in un volume di 25 µL contenenti (Tab. 3).

Tabella 3: Reagenti con le relative quantità per l'amplificazione.

Reagenti	µL per una reazione	µL per 67 reazioni
Acqua	8,6	576,2
Master Mix 2X	12,5	837,5
Primer F	1,2	80,4
Primer R	1,2	80,4
DNA (1:40)	1,5	

In ciascuna provetta è stato inserito il DNA da analizzare (1,5 µL) opportunamente diluito (1:40). Per gli esperimenti di PCR sono stati utilizzati "primer" che amplificano porzioni altamente conservate dell'acido nucleico ribosomico nella sua componente 16S (Lee et al., 1993; Schneider et al., 1993; Namba et al., 1993) seguendo i parametri

pubblicati (Schaff et al., 1992). In particolare, è stata effettuata una prima amplificazione diretta impiegando gli oligonucleotidi universali P1/P7 (Deng & Hiruki, 1991; Smart et al., 1996; Tab. 4) che amplificano un frammento di circa 1.800 nucleotidi (PCR diretta) del gene ribosomico che si estende dall'estremità 5' del gene codificante il 16S rRNA all'estremità 3' del gene codificante il 23S rRNA.

Tabella 4: Sequenze di primer universali per fitoplasmi.

P1/P7 (Deng & Hiruki, 1991; Smart et al., 1996)
P1 5'- AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT-3'
P7 5'- CGTCCTTCATCGGCTCTT- 3'
R16F2/R2(Lee et al., 1995)
R16F2 5'- ACG ACT GCT AAG ACT GG-3'
R16R2 5'-TGA CGG GCG GTG TGT ACA AAC CCC G-3'

Ad essa è seguita una seconda amplificazione (PCR "nested", Fig. 11) effettuata sui prodotti della prima, diluiti 1:30 con acqua sterile. In questa seconda reazione sono stati impiegati gli oligonucleotidi universali R16F2/R2 (Lee et al., 1995; Tab. 4) che amplificano un frammento di circa 1.200 pb interno al precedente.

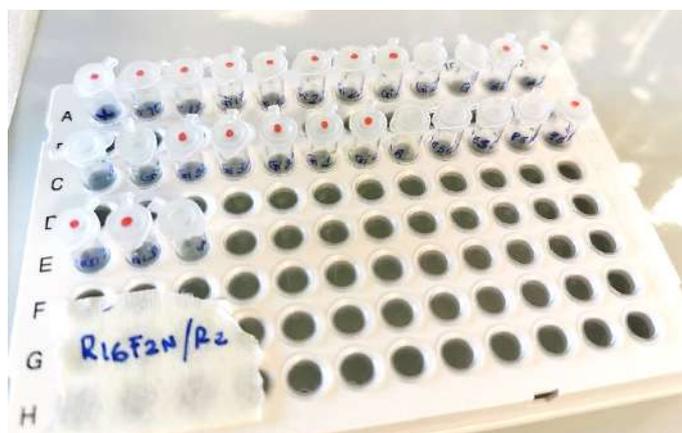


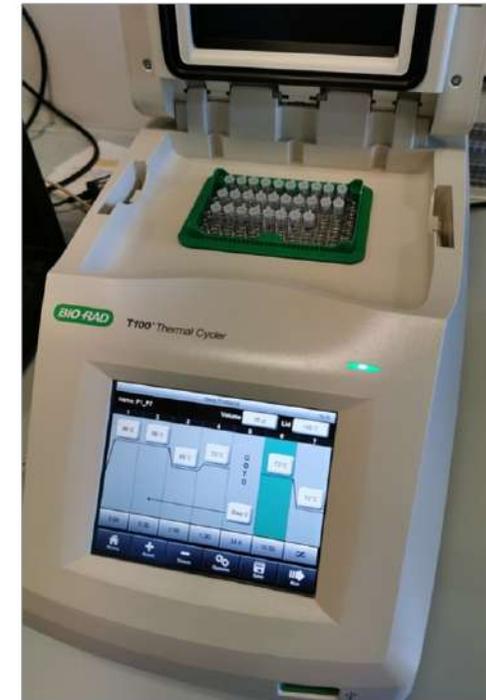
Figura 11: Campioni per la nested PCR. I positivi evidenziati con puntino rosso sul tappo.

Per gli esperimenti di PCR si è utilizzato un termociclatore BIORAD T100 (Fig. 12) con il quale è stato eseguito il seguente ciclo di amplificazione (Tab. 4), specifico per ogni coppia di primer.

Tabella 5: Descrizione dei cicli di amplificazione.

primer P1/P7	Primer R16F2/R2	Note
95°C per 2:00 min	95°C per 2:00 min	In questa fase la doppia elica di DNA viene completamente separata e i filamenti diventano svincolati l'uno dall'altro (fase di denaturazione).
95°C per 0:30 min 55°C per 1:00 min ^a 72°C per 1:30 min ^b Ripetuto 34 volte	95°C per 0:30 min 55°C per 1:00 min ^a 72°C per 1:30 min ^b Ripetuto 34 volte	^a L'abbassamento di temperatura permetterà ai primer di legarsi alle regioni complementari dei filamenti di DNA denaturati (fase di annealing); ^b L'ulteriore innalzamento della temperatura sarà finalizzato a massimizzare l'azione della TAQ polimerasi che partendo dai primer determinerà la sintesi di un nuovo filamento su quello stampo (fase di allungamento).
72°C per 5 min	72°C per 5 min	

Figura 12. Impostazione dei cicli di amplificazione sul termociclatore ed apposizione di eppendorf sullo stesso.



2.4 Visualizzazione dei risultati dell'amplificazione genica mediante elettroforesi

Al termine dell'amplificazione, è stato predisposto tutto il necessario per la corsa elettroforetica:

- 1) il gel è stato preparato in un becher da 100 mL. Il TAE 1x è una soluzione composta da Tris base, acido acetico glaciale 100%, EDTA e H₂O. È stato aggiunto 1.5 g di agarosio, portato a ebollizione su di una piastra riscaldante per far sì che il polimero si sciogla, anche grazie all'aiuto di un'ancoretta magnetica in continua rotazione sul fondo del becher. Il tutto viene tolto dalla piastra quando la soluzione diventa trasparente. La soluzione è stata fatta raffreddare a temperatura ambiente;
- 2) Il composto è stato versato in un supporto predisposto facendo attenzione a non creare bolle d'aria (che potrebbero ostacolare la corsa del DNA). Prima che il gel si solidifichi è stato inserito un pettine che determinerà le dimensioni dei pozzetti nei quali saranno caricati i campioni.
- 3) Una volta che il gel si è solidificato, sono stati caricati i campioni precedentemente preparati con un opportuno colorante (il quale fungerà da indicatore di corsa), da sinistra verso destra. Il primo pozzetto è utilizzato per caricare il marker 100 bp, che presenta specifiche bande da 100 a 1000 bp, gli altri di seguito sono stati caricati 10 µL per ciascun campione analizzato. Nella reazione di amplificazione e quindi anche nel gel sono stati caricati inoltre, il controllo positivo (DNA di Stolbur, STOL) e un controllo negativo (acqua sterile).
- 4) la cella elettroforetica è stata chiusa, collegata al generatore di corrente. I campioni sono stati fatti correre in tampone TAE a 100 V per 30 minuti (Fig. 13 sinistra). Al termine della corsa, il gel è stato estratto dal supporto per osservarlo ai raggi UV tramite il transilluminatore BIO-RAD Gel Doc XR provvisto di sistema per l'acquisizione di immagini (Fig. 13 destra).

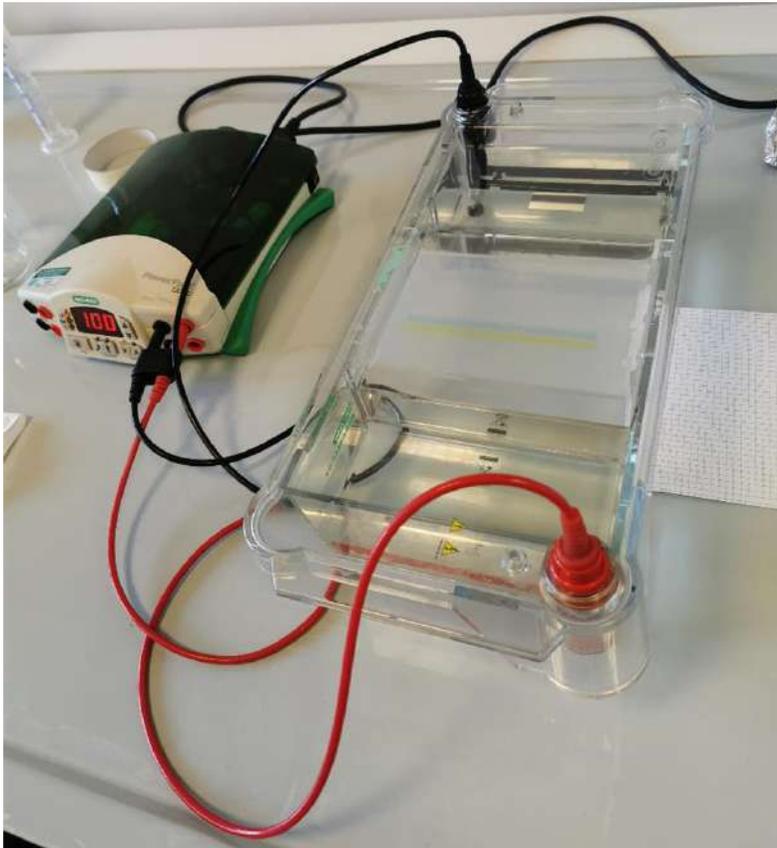


Figura 13: Cella elettroforetica (sinistra), transilluminatore Gel Doc XR (BioRad).

Alcuni campioni di ginestra, risultati positivi all'amplificazione genica con i primer universali R16F2n/R2 per i fitoplasmi, sono stati purificati e mandati a Genewiz UK per essere sequenziati. La sequenza nucleotidica ottenuta, predisposta in formato FASTA ,è stata utilizzata per l'analisi BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), che permette di verificare la percentuale di similarità della sequenza da noi ottenuta (*query*) con le sequenze nucleotidiche presenti nel database NCBI.

CAPITOLO 3 RISULTATI

3.1 Osservazione dei sintomi

Durante le fasi di sopralluogo avvenute tra maggio e ottobre del 2020, sono stati riscontrati nuclei di piante di ginestra che presentavano anomalie per quanto riguarda lo sviluppo vegetativo (Fig. 14).



Figura 14: Cespugli di ginestra con anomalie nello sviluppo vegetativo.

La sintomatologia più ricorrente è stata caratterizzata da scopazzi, fasciazione del fusto e disseccamento dei cespugli.

Gli scopazzi sono formazioni in genere determinate dai fitoplasmi, ma anche da alcuni funghi, che interferiscono con il metabolismo ormonale della pianta ospite (Fig. 15). La pianta infetta presenta in genere una proliferazione abbondante di gemme, con un anticipo nella chiusura delle gemme a legno, per cui i germogli risultano affastellati. L'aspetto dei germogli con internodi raccorciati conferisce la forma di scopa alla vegetazione.



Figura 15: Deformazioni (scopazzi) dovute all'alterazione del metabolismo.

Un altro sintomo che accompagna gli “scopazzi” è la fasciazione dei fusti (Fig. 16). In particolare, i fusti ad asse normalmente cilindrico o prismatico, si presentano appiattiti e allargato a guisa d’una fascia. Il ramo fasciato spesso è ricurvo o avvolto a spirale a causa di irregolare sviluppo. La fasciazione può derivare da concrescenza di più rami o da appiattimento di un solo ramo. Può avvenire per cause di tipo fisiologico o essere indotto da infezioni da fitoplasmi e virus, agenti in grado di manipolare il metabolismo ormonale con ripercussioni anche sulla plasticità della pianta stessa.



Figura 16: Fascinazione dei fusti.

Un' ulteriore anomalia riscontrata sui cespugli di ginestra è stata la “fillodia” (Fig. 17) che consiste nella trasformazione di organi fiorali in foglie o germogli. È generalmente causato da fitoplasmi o infezioni virali, sebbene possa anche essere dovuto a fattori ambientali che determinano uno squilibrio negli ormoni vegetali.

La fillodia fa sì che la pianta colpita diventi parzialmente o completamente sterile, poiché non è in grado di produrre normalmente fiori.



Figura 17: Fillodia.

Il sintomo, che è stato riscontrato e si è intensificato con il sopraggiungere dei mesi estivi, è stato il disseccamento parziale dei fusti che presentavano fasciatura o il deperimento completo del cespuglio (Fig. 18).



Figura 18: Disseccamento.

In particolare, tali alterazioni riguardavano cespugli che erano cresciuti come bordura stradale nella zona Montedago e all'interno del Campus (Fig. 19). Da ben 65 cespugli di ginestra geolocalizzati è stato prelevato il materiale vegetale, che portato in laboratorio è stato sottoposto all'estrazione del DNA totale.



Figura 19: Marker rossi indicanti i luoghi di ritrovamento e raccolta dei campioni. A destra il Parco del Cardeto, a sinistra la zona Montedago (Ancona).

I 65 campioni raccolti (35 sintomatici e 30 asintomatici), sono stati sottoposti ad estrazione del DNA. Il metodo di estrazione utilizzato proposto da Murolo et al. (2014), pur essendo stato utilizzato precedentemente per la diagnosi su foglie di vite, con qualche modifica minore è risultato particolarmente efficiente partendo da germogli di ginestra. La tecnica utilizzata per l'estrazione del DNA genomico ha consentito in circa 4 h di processare circa 24 campioni, con una resa di circa 100-200 mg/ μ l di DNA per ciascun isolato. Inoltre, la valutazione al biofotometro ha permesso di verificare anche un'ottima qualità del DNA che in genere aveva un rapporto $A_{260}/_{280} > 1,87$ e $A_{260}/_{230} > 1,81$.

I campioni sono stati sottoposti a una prima amplificazione utilizzando i primer universali P1/P7. In nessun campione è stato possibile amplificare alcuna banda specifica. Solo con la nested PCR, utilizzando una coppia di primer (R16F2/R2n), interna alla regione già amplificata e specifica per la regione ribosomica 16Sr, è stato possibile ottenere un amplicone specifico di circa 1200 bp, simile a quello ottenuto nel controllo positivo (Stol19_25) (Fig. 20).

Dei 65 campioni analizzati, 35 sintomatici sono risultati positivi in PCR, mentre i campioni che non mostravano sintomi (30), sono risultati negativi insieme al controllo negativo e all'acqua.

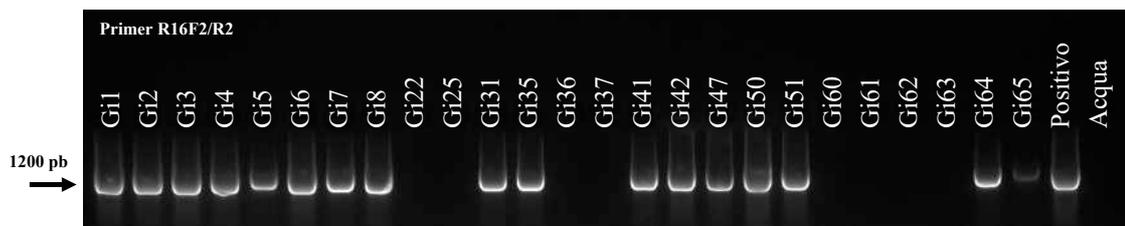


Figura 20. Gel di agarosio su cui sono stati caricati campioni di ginestra rappresentativi di diverse aree monitorate. I campioni che mostrano la banda della lunghezza di circa 1200 pb, sono i campioni infetti da fitoplasmii.

Di seguito, nella Tabella 6 viene riportata per ciascuno dei 65 campioni la tipologia di sintomo mostrato (scopazzi, fasciazione, fillodia, disseccamento) e i risultati della diagnosi molecolare.

Tabella 6: Sintomatologia e risultati diagnosi molecolare.

ID	Località/ Regione	Sintomi				Diagnosi molecolare	
		S ¹	Fa ²	Fi ³	D ⁴	P1/P7	R16F2/R2
G11	Parco del Cardeto, Ancona, Marche	x			x	neg	pos
G12	Parco del Cardeto, Ancona, Marche	x			x	neg	pos
G13	Parco del Cardeto, Ancona, Marche	x		x	x	neg	pos
G14	Parco del Cardeto, Ancona, Marche	x				neg	pos
G15	Parco del Cardeto, Ancona, Marche	x	x	x		neg	pos
G16	Parco del Cardeto, Ancona, Marche	x	x			neg	pos
G17	Parco del Cardeto, Ancona, Marche	x	x	x		neg	pos
G18	Parco del Cardeto, Ancona, Marche	x			x	neg	pos
G19	Parco del Cardeto, Ancona, Marche	x				neg	pos
G110	Parco del Cardeto, Ancona, Marche	x	x	x		neg	pos
G111	Parco del Cardeto, Ancona, Marche	x	x			neg	pos
G112	Parco del Cardeto, Ancona, Marche					neg	neg
G113	Parco del Cardeto, Ancona, Marche					neg	neg
G114	Parco del Cardeto, Ancona, Marche				x	neg	neg
G115	Parco del Cardeto, Ancona, Marche					neg	neg
G116	Parco del Cardeto, Ancona, Marche					neg	neg
G117	Parco del Cardeto, Ancona, Marche					neg	neg
G118	Tavernelle, Ancona, Marche				x	neg	neg
G119	Tavernelle, Ancona, Marche					neg	neg
G120	Tavernelle, Ancona, Marche					neg	neg
G121	Tavernelle, Ancona, Marche	x	x	x		neg	pos
G122	Tavernelle, Ancona, Marche	x				neg	pos
G123	Tavernelle, Ancona, Marche					neg	neg
G124	Tavernelle, Ancona, Marche	x	x		x	neg	pos
G125	Tavernelle, Ancona, Marche					neg	neg
G126	Tavernelle, Ancona, Marche	x				neg	pos
G127	Tavernelle, Ancona, Marche	x	x	x		neg	pos
G128	Tavernelle, Ancona, Marche	x				neg	pos
G129	Sirolo, Ancona, Marche					neg	neg
G130	Tavernelle, Ancona, Marche	x			x	neg	pos
G131	Tavernelle, Ancona, Marche	x	x			neg	pos
G132	Sirolo, Ancona, Marche	x				neg	pos

Gi33	Sirolo, Ancona, Marche				x	neg	neg
Gi34	Sirolo, Ancona, Marche					neg	neg
Gi35	Campus Montedago, Ancona, Marche	x	x	x		neg	pos
Gi36	Numana, AN, Marche					neg	neg
Gi37	Numana, AN, Marche					neg	neg
Gi38	Numana, AN, Marche					neg	neg
Gi39	Numana, AN, Marche					neg	neg
Gi40	Numana, AN, Marche	x				neg	pos
Gi41	Campus Montedago, Ancona, Marche	x	x	x		neg	pos
Gi42	Campus Montedago, Ancona, Marche	x	x	x		neg	pos
Gi43	Val di Castro, Fabriano, AN, Marche					neg	neg
Gi44	Val di Castro, Fabriano, AN, Marche					neg	neg
Gi45	Val di Castro, Fabriano, AN, Marche					neg	neg
Gi46	Val di Castro, Fabriano, AN, Marche					neg	neg
Gi47	Tavernelle, Ancona, Marche	x				neg	pos
Gi48	Val di Castro, Fabriano, AN, Marche					neg	neg
Gi49	Val di Castro, Fabriano, AN, Marche					neg	neg
Gi50	Tavernelle, Ancona, Marche	x			x	neg	pos
Gi51	Tavernelle, Ancona, Marche	x	x	x		neg	pos
Gi52	Val di Castro, Fabriano, AN, Marche					neg	neg
Gi53	Val di Castro, Fabriano, AN, Marche					neg	neg
Gi54	Val di Castro, Fabriano, AN, Marche					neg	neg
Gi55	Val di Castro, Fabriano, AN, Marche					neg	neg
Gi56	Acquasanta Terme, AP, Marche					neg	neg
Gi57	Acquasanta Terme, AP, Marche					neg	neg
Gi58	Acquasanta Terme, AP, Marche					neg	neg
Gi59	Acquasanta Terme, AP, Marche					neg	neg
Gi60	Acquasanta Terme, AP, Marche					neg	neg
Gi61	Acquasanta Terme, AP, Marche					neg	neg
Gi62	Acquasanta Terme, AP, Marche					neg	neg
Gi63	Parco del Cardeto, Ancona, Marche	x	x		x	neg	pos
Gi64	Parco del Cardeto, Ancona, Marche	x	x	x		neg	pos
Gi65	Parco del Cardeto, Ancona, Marche	x			x	neg	pos

¹ Scopazzi; ² Fasciazione; ³ Fillodia, ⁴ Disseccamento

In particolare, i 35 campioni risultati positivi in PCR presentavano almeno due dei sintomi associati a infezioni da fitoplasmi. Il sintomo riscontrato su tutti i positivi sono

gli scopazzi (35/35), seguito dalla fasciazione (15/35) e dalla fillodia (11/35). Dei campioni analizzati 8 hanno mostrato solo il sintomo di scopazzi, mentre i restanti 27 campioni positivi hanno presentato oltre agli scopazzi contemporaneamente anche altri sintomi. Il disseccamento registrato in 12 campioni non è strettamente associato all'infezione da fitoplasm, in quanto è stato anche riscontrato su campioni che non presentavano altri sintomi e sono risultati negativi all'analisi molecolare.

Dall'analisi Blast N delle sequenze nucleotidiche è emerso che dei frammenti amplificati con i primer R16F2n/R2, sottoposti al sequenziamento, tutti hanno mostrato un'elevata percentuale di similarità (99,91%) con altri isolati appartenenti al gruppo ribosomiale 16Sr V, ma anche con il fitoplasma agente causale della flavescenza dorata ('*Ca. P. vitis*') (Fig.21).

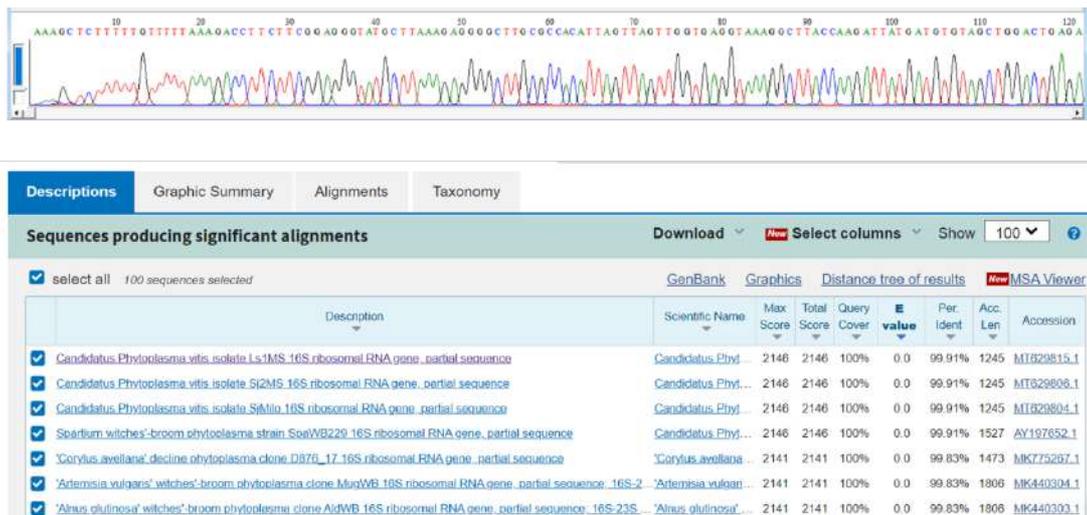


Figura 21: sopra “cromatogramma riportante la sequenza ottenuta; in basso risultati dell’analisi Blast N, che ha consentito di definire la percentuale di similarità della sequenza nucleotidica confrontandola con le sequenze presenti nel database NCBI.

CAPITOLO 4

DISCUSSIONE

Grazie alla presente ricerca, è stata segnalata per la prima volta nelle Marche la diffusione di “scopazzi della ginestra”, determinata da fitoplasmi appartenenti al gruppo ribosomale 16 SrV. Tale fitoplasma era già stato segnalato in precedenza in altre regioni italiane del centro - sud Italia e in diverse regioni della Spagna (Marcone et al., 1996; Torres et al., 2002; Spallino et al., 2017). Attualmente la diffusione degli scopazzi della ginestra nelle Marche sembra limitata a sporadiche aree, localizzate in provincia di Ancona. Ma l'evidente comparsa suggerisce la presenza di vettori attivi coinvolti nella diffusione del fitoplasma. Nell'areale oggetto di studio, non sono disponibili dati dell'entomofauna raccolta su cespugli di ginestra. In recenti studi ecologici condotti in Sicilia, Rizza et al. (2021) hanno identificato fitoplasmi appartenenti al sottogruppo 16SrV-C e 'Ca. P. spartii' (16SrX) in piante di ginestra sintomatici localizzate in 17 punti diversi della regione e nel 65% degli adulti di *L. spectabilis*, monofago su ginestra spagnola. Le piante infette mostrano una vasta gamma di sintomi. Dalla presente ricerca emerge che il sintomo strettamente legato alle infezioni è l'affastellamento della vegetazione (scopazzi). Molte delle piante che mostravano sintomi sono poi andate incontro anche al deperimento e infine al disseccamento. Tale sintomo, non strettamente collegato alle infezioni da fitoplasmi, ma accentuato dalle condizioni ambientali, soprattutto scarsità di pioggia ed elevate temperature, può amplificare il rischio di incendi ed avere un impatto sul paesaggio.

In letterature emerge che oltre all'impatto ecologico e sul paesaggio, le piante di ginestra notoriamente ricche in olii essenziali, quando infette dai fitoplasmi presentano una resa minore, ma soprattutto caratteristiche qualitative inferiori rispetto alle piante sane (Mancini et al., 2010).

La presenza di fitoplasmi del gruppo 16SrV-C in *S. junceum* nelle Marche necessita di ulteriore attenzione, in quanto tale fitoplasma è lo stesso agente causale della flavescenza dorata (FD) della vite (EFSA Panel on Plant Health (PLH) et al., 2016). Il patosistema FD coinvolge principalmente *Vitis* spp., fitoplasmi appartenenti ai sottogruppi -C e -D del gruppo 16SrV, e la cicalina *S. titanus*, che è il più importante vettore naturale della malattia (EFSA Panel on Plant Health [PLH] , 2014). Mentre *S.*

titanus è stato probabilmente introdotto dagli USA in Europa negli anni '50 (EFSA Panel on Plant Health [PLH], 2014), i fitoplasmi del gruppo 16SrV erano già presenti nell'UE, mostrando un'evidente diversità genomica per diversi loci (Arnaud et al., 2007; Malembic-Maher et al., 2020). Dopo la sua introduzione, *S. titanus* è diventato casualmente un vettore minaccioso di alcuni di questi genotipi 16SrV per la vite, a causa del suo comportamento ampelofago predominante (Chuche e Thiéry, 2014).

Attualmente nelle Marche, l'ASSAM ha prontamente individuato e circoscritto diversi focolai di FD nelle zone viticole dei comuni di Altidona, Belforte del Chienti, Colli al Metauro, Cossignano, Cupramarittima, Fano, Gradara, Morro d'Alba, Offida, Pesaro (PU), Ripatransone, San Lorenzo in Campo, Tavullia, Tolentino, Treia (Decreto Regionale n. 104, 30/04/2020, Fig. 22), in cui risulta anche presente il principale vettore *S. titanus*.

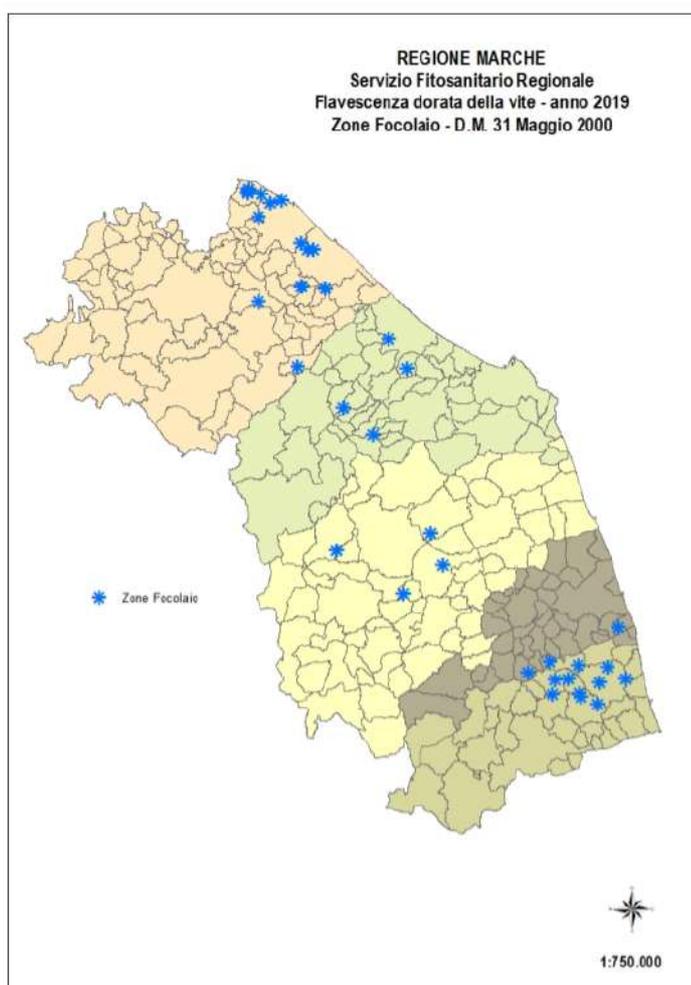


Figura 22: Mappa generale zone focolai della Regione Marche (Decreto del Dirigente n. 104 del 30 aprile 2020).

CONCLUSIONI

La presente ricerca ha permesso di focalizzare l'attenzione su una specie di elevata importanza paesaggistica ed ecologica e segnalare per la prima volta nelle Marche la presenza di piante infette da “scopazzi della ginestra”. Il rinvenimento di piante di ginestre infette da fitoplasmi appartenenti al gruppo ribosomale 16SrV-C, strettamente legato all'agente causale della Flavescenza dorata, agente da quarantena, la presenza nella regione Marche di focolai di FD e il rinvenimento del principale vettore *S. titanus*, impone massima attenzione, suggerisce l'importanza nel monitoraggio dell'infezione da fitoplasma di *S. junceum* nelle aree viticole della regione Marche in cui è presente FD e fa sorgere una serie di quesiti a cui presto bisognerà rispondere:

- 1) Può la vite essere infettata dal fitoplasma 16SrV-C rinvenuto su ginestra?
- 2) Può la ginestra essere stata infetta da fitoplasmi 16SrV-C presenti su vite?
- 3) Quali sono gli insetti che possono contribuire come vettori alla trasmissione di tale agente su piante di ginestra?

BIBLIOGRAFIA

Alma A., Bosco D., Danielli A., Bertaccini A., Vibio M., Arzone A., 1997. Identification of phytoplasmas in eggs, nymphs and adults of *Scaphoideus titanus* Ball reared on healthy plants. *Insect Molecular Biology* 6, 115-121.

Ansaldi M., Medda E., Plastino S., 1994. *I fiori delle Apuane*.

Arnaud, G., Malembic-Maher, S., Salar, P., Bonnet, P., Maixner, M., Marcone C. et al., 2007. Multilocus sequence typing confirms the close genetic interrelatedness of three distinct flavescente dorée phytoplasma strain clusters and group16SrV phytoplasmas infecting grapevine and alder in Europe. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 4001-4010.

Bertaccini A., 2019. The phytoplasma classification between ‘Candidatus species’ provisional status and ribosomal grouping system. *Phytopathogenic Mollicutes* 9, 1-2.

Bezić N., Dunkić V., Radonić A., 2003. Anatomical and chemical adaptation of *Spartium junceum* L. in arid habitat. *Acta Biol Cracov Bot* 45, 43–47.

Biondi E., Allegrezza M., Baldoni M., Casavecchia S., Pinzi M., Taffetani F., 2010. Le serie di vegetazione della Regione Marche, Università Politecnica delle Marche - Dipartimento di Scienze Ambientali e delle Produzioni Vegetali.

CABI, 2019. Invasive Species Compendium, Detailed coverage of invasive species threatening livelihoods and the environment worldwide.

<https://www.cabi.org/isc/datasheet/51145#9a096b3c-510d-4d36-b404-faa0301f0df9>

Chen K.H., Guo J.R., Wu X.J., Loi N., Carraro L., Guo H.J., Chen Y.D., Osler R., Pearson R., Chen T.A., 1993. Comparison of monoclonal antibodies, DNA probes, and PCR for detection of the grapevine yellows disease agent. *Phytopathology* 83, 915-922.

Conti F., Abbate G., Alessandrini A., Blasi G., 2005. Flora Iberica - Plantas vasculares del la Península Iberica e Islas Baleares. *An Annotated Checklist of the Italian Vascular Flora*.

Chuche J. & Thiéry D., 2014. Biology and ecology of the flavescence dorée vector *Scaphoideus titanus*: a review. *Agronomy for Sustainable Development* 34, 381–403.

Deng S., Hiruki C., 1991. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and nonculturable Mollicutes. *Journal of Microbiological Methods* 14, 53–61.

EFSA Panel on Plant Health (PLH) (2014) Scientific opinion on pest categorisation of grapevine flavescence dorée. *EFSA Journal* 12, 3851.

EFSA Panel on Plant Health (PLH), Jeger, M., Bragard, C., Caffier, D., Candresse, T., Chatzivassiliou E. et al., 2016 Risk to plant health of flavescence dorée for the EU territory. *EFSA Journal*, 14, e04603.

Gavilán R.G., Sánchez-Mata D., Gaudencio M., Gutiérrez-Girón A., Vilches B, 2016. Impact of the non-indigenous shrub species *Spartium junceum* (Fabaceae) on native vegetation in central Spain. *Journal of Plant Ecology* 9, 132-143.

Lanzara P., 1997. *Piante medicinali* 4, 110-111.

Lee I-M., Hammond R.W., Davis R.E., Gundersen D.E., 1993. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology* 83, 834-842.

Lee I-M., Bertaccini A., Vibio M., Gundersen D.E., 1995. Detection of multiple phytoplasmas in perennial fruit trees with decline symptoms in Italy. *Phytopathology* 85, 728-735.

Lee I-M., Davis R.E., Gundersen-Rindal D.E., 2000. Phytoplasmas: phytopathogenic mollicutes. *Annual Review of Microbiology* 56, 1593-1597.

Mancini E., Marccone C., De Martino L., De Feo V., 2010. Profili alcaloidei di piante di ginestra affette da spartium witches' broom. *Petria* 20, 718-721.

Marccone C., Ragozzino A, Schneider B., Lauer U., Smart C. D., Seemuller H., 1996. Genetic characterization and classification of two phytoplasmas associated with spartium witches' broom disease. *Plant Dis.* 80, 365-371.

Marccone, C., Neimark, H., Ragozzino, A., Lauer, U. & Seemuller, E. 1999. Chromosome sizes of phytoplasmas composing major phylogenetic groups and subgroups. *Phytopathology* 89, 805–810.

Malembic-Maher S., Desqué D., Khalil D., Salar P., Bergey B., Danet J.L. et al. 2020. When a Palearctic bacterium meets a Nearctic insect vector: Genetic and ecological insights into the emergence of the grapevine flavescence dorée epidemics in Europe. *PLoS Pathogens* 16, e1007967 (doi:<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007967.g001>).

McCoy R. E., Caudwell, A., Chang, C. J. et al., 1989. Plant diseases associated with mycoplasma-like organisms. *In The Mycoplasmas* 5, 545–640.

Murolo S., Mancini V., Romanazzi G., 2014. Spatial and temporal stolbur population structure in a cv. Chardonnay vineyard according to vmp1 gene characterization. *Plant Pathology* 63, 700-707.

Namba S., Kato S., Iwanami S., Oyaizu H., Shiozawa H., Tsuchizaki T., 1993. Detection and differentiation of plant-pathogenic mycoplasma-like organisms using polymerase chain reaction. *Phytopathology* 83, 786-791.

Pignatti S., 1982. *Flora d'Italia*, 3 vol. Edagricole, Bologna.

Preti F., Giadrossich F., 2009. Root reinforcement and slope bioengineering stabilization by Spanish Broom (*Spartium junceum* L.), *Hydrol. Earth Syst. Sci.* 13, 1713–1726.

Rizza S., Rossi M., Spallino R. E., Tedeschi R., Marzachi C., Catara V., Matilde T., 2021. Ecology-based analysis of a recent association between *Spartium junceum* and 16SrV phytoplasma. *Plant Pathology* 70, 305-317.

Schaff D.A., Lee I.-M., Davis R.E. 1992. Sensitive detection and identification of mycoplasma-like organisms by polymerase chain reactions. *Biochemistry Biophysics Research Communications* 186, 1503-1509.

Schneider B., Ahrens U., Kirkpatrick B.C., Seemüller E., 1993. Classification of plant-pathogenic mycoplasma-like organisms using restriction-site analysis of PCR-amplified 16S rDNA. *Journal of General Microbiology* 139, 519-527.

Seemüller E., Marcone C., Lauer U., Ragozzino A. & Goschl M., 1998. Current status of molecular classification of the phytoplasmas. *J. Plant Pathol.* 80, 3–26.

Smart C.D., Schneider B., Morrer R., Blomquist D.J., Guerra L.J., Harrison N.J., Ahrens U., Lorenze K.H., Seemüller E., Kirkpatrick B.C., 1996. Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of the 16S–23S rRNA spacer region. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 2988–93.

Spallino R.E., Rizza S., Oliveri C., Catara V., Marzachi C., & Tessitori M., 2017. Plant teratologies as a result of phytoplasma infections. *Plant Biosystems* 151, 931-939.

Tedeschi R., Ferrato V., Rossi J., Alma A. 2006. Possible Phytoplasma transovarial transmission in the psyllids *Cacopsylla melanoneura* and *Cacopsylla pruni*. *Plant Pathology* 55, 18–24.

Torres E., Botti S., Paltrinieri S., Martin M.P., & Bertaccini A., 2002. First report of *Spartium* witches' broom disease in Spain. *New Disease Reports* 5, 14.

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio mamma e papà, senza i quali tutto questo non sarebbe stato possibile, ed il professor Sergio Murolo, che, nonostante il periodo di pandemia, ha trovato il modo di aiutarmi e guidarmi in questo percorso.