



# Monitoraggio dei meleti del Canavese colpiti da fitoplasmi agenti causali di AP (Apple Proliferation)<sup>(1)</sup>

Massimo Pinna, Ursula Gamba, Sandra Spagnolo, Patrizia Zaccara<sup>(\*)</sup> – Rosemarie Tedeschi<sup>(\*\*)</sup> – Sergio Gallo<sup>(\*\*\*)</sup>

## Introduzione

### Cenni Storici

Gli scopazzi del melo (**apple proliferation**) sono considerati tra le più gravi malattie di questa pomacea; sono causati da un fitoplasma (AP) in stretta relazione filogenetica con gli agenti dei giallumi delle drupacee, della moria del pero e della leptonecrosi del susino.

La malattia è stata descritta per la prima volta in Italia nel 1950, in Veneto e in Trentino. In Piemonte, l'Alto Canavese rappresenta il focolaio storico della malattia. Negli ultimi cinque anni, numerose segnalazioni di tecnici ed agricoltori hanno tuttavia evidenziato l'estensione della fitopatia al di fuori degli areali di origine ed anche in provincia di Cuneo.

### Modalità di trasmissione dell'AP

Il fitoplasma può essere trasmesso attraverso materiale di propagazione infetto (innesto), anastomosi radicale e tramite punture di suzione di insetti vettori appartenenti all'ordine dei Rincoti. I vettori dell'AP accertati in Italia sono le psille *Cacopsylla costalis* (Flor) e *Cacopsylla melanoneura* (Förster).

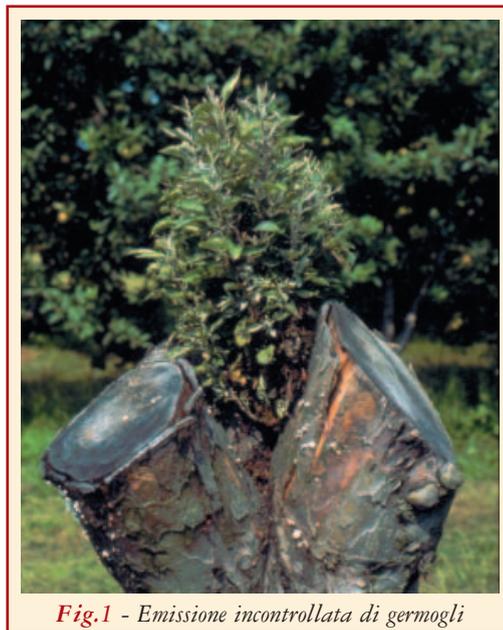


Fig.1 - Emissione incontrollata di germogli

Secondo molti ricercatori è da escludere la trasmissione della malattia tramite ferite o tagli di potatura.

*C. costalis* e *C. melanoneura* sono state ritrovate sulle seguenti piante ospiti: *Taxus baccata*, *Crataegus oxyacantha*, *C. monogyna*, *Pyrus communis*, *Malus domestica* (Culatti).

In Piemonte sono frequenti i reperimenti di *C. melanoneura* mentre non è ancora stata accertata la presenza di *C. costalis* (Alma, 2000).

<sup>(1)</sup> Lavoro eseguito con il contributo della Regione Piemonte e della Provincia di Torino.

<sup>(\*)</sup> CRAB Centro di Riferimento per l'Agricoltura Biologica-Provincia di Torino – Via S.Vincenzo, 48 – 10060 Bibiana (TO)

<sup>(\*\*)</sup> Di.Va.P.R.A. Settore Entomologia e Zoologia applicata all'Ambiente "Carlo Vidano" Facoltà di Agraria Via Leonardo da Vinci, 44 – 10095 Grugliasco (TO)

<sup>(\*\*\*)</sup> Settore Fitosanitario Regione Piemonte – Via Livorno, 60 – 10147 Torino

## *Biologia di C. melanoneura*

*C. melanoneura* compie una generazione all'anno con svernamento allo stadio di adulto. A fine gennaio gli adulti svernanti iniziano a colonizzare il melo raggiungendo un picco intorno alla metà di marzo. In aprile compaiono i giovani, i primi adulti sfarfallano verso la fine del mese. Essi tendono ad abbandonare rapidamente i meli per spostarsi su ospiti diversi per l'estivazione e lo svernamento (Tedeschi et al., 2002).

## *Sintomatologia*

I sintomi su melo, descritti sino ad ora, imputabili alla presenza del fitoplasma agente causale di AP possono essere riassunti come segue:

- 1 emissione incontrollata di germogli laterali sui rami dell'anno (scopazzi) (Fig.1 e 4)
- 2 ripresa vegetativa anticipata
- 3 formazione di rosette di foglie all'apice dei germogli (Fig.5)
- 4 fioriture fuori stagione (Fig.6)
- 5 foglie piccole, allungate e con margini seghettati
- 6 stipole di dimensioni superiori alla norma (Fig.7)
- 7 arrossamenti degli apici vegetativi
- 8 frutti di dimensioni inferiori alla norma, con picciolo allungato e colorazione che permane verde (Fig.8)
- 9 affastellamento vegetativo dell'intera pianta (Fig.9).

## *Tecniche di contenimento*

Non esistono mezzi di lotta diretti per il controllo di malattie causate da fitoplasmi, quando queste si manifestino in colture già in atto; per questa ragione sono fondamentali interventi preventivi:

- evitare i rinnovi parziali dei meleti onde scongiurare la contemporanea presenza di piante sane e infette, ma procedere, in previsione del rinnovo del meleto, ad una sostituzione totale e contemporanea;
- utilizzare esclusivamente materiale di propagazione certificato;
- contenere le popolazioni dei vettori, tramite interventi insetticidi, almeno nei primi anni;
- eliminare i meleti incolti limitrofi, possibili focolai di infezione.

## *Ripercussioni sulle produzioni*

L'AP causa una diminuzione della pezzatura dei frutti e quindi un loro deprezzamento, inoltre orienta la pianta a spendere un maggior quantitativo di risorse a favore della fase vegetativa e a discapito di quella riproduttiva. Nonostante questo è stato osservato che piante sintomatiche possono nel tempo non manifestare più i sintomi e quindi sopportare una produzione accettabile pur restando positive alle analisi. La possibilità di procedere all'espianto di un meleto in piena produzione in presenza della malattia è quindi da valutare attentamente.

## *Il monitoraggio in Provincia di Torino*

Nella primavera del 2002 è stata avviata un'indagine per conoscere la diffusione della malattia sul territorio regionale, approfondire le conoscenze sulle modalità di trasmissione del fitoplasma e sulla biologia dei suoi vettori; l'indagine è realizzata da un gruppo di lavoro coordinato dal Settore Fitosanitario della Regione Piemonte al quale partecipano il Di.Va.P.R.A. Settore Entomologia e Zoologia applicata all'Ambiente "Carlo Vidano" e il CRAB Centro di Riferimento per l'Agricoltura Biologica della Provincia di Torino ed il CreSO.

### *Obiettivi*

Con l'intenzione di prevenire un'ulteriore diffusione della malattia sono state avviate le seguenti indagini preliminari:

- mappatura dei Comuni e dei frutteti in cui sono presenti sintomi di AP;
- determinazione dell'entità dei focolai presenti in meleti abbandonati e in altri incolti;
- riconoscimento dei sintomi nelle diverse fasi fenologiche della pianta;
- organizzazione di momenti informativi per agricoltori e tecnici con l'intento di sensibilizzare sull'entità del problema, sulle possibilità di riconoscimento in campo della malattia e sulle profilassi da adottare;
- monitoraggio e studio dei possibili insetti vettori, del loro ciclo e della loro diffusione sul territorio;
- individuazione di altre specie vegetali ospiti di *C. melanoneura*;
- analisi di laboratorio per l'identificazione del fitoplasma agente della malattia, sia all'interno dei vettori, sia nelle piante riconosciute come infette.

### *Mappatura dei Comuni*

In questo primo anno di attività il monitoraggio ha riguardato i comuni inseriti nella Comunità Montana Alto Canavese (riconosciuti come focolaio storico della malattia) e quelli in cui è stata data segnalazione della presenza di sintomi sospetti: Maglione, Borgomasino, Moncrivello, Borgo d'Ale, Alice Castello, Villareggia, Mazzè e Caluso (Figg.2-3).

Su indicazione di tecnici ed agricoltori sono stati individuati 40 appezzamenti, tra frutteti ed incolti, in ognuno dei quali è stato effettuato un sopralluogo, a partire dal mese di giugno. L'obiettivo era quello di rilevare la presenza della malattia, la gravità con cui si manifesta e la sintomatologia in relazione a: fase fenologica, cultivar ed età della pianta. Per questi rilievi era stata redatta apposita scheda.

### *Rilievi sintomatologici*

Allo scopo di studiare l'evoluzione sintomatologica di AP nel corso della stagione, è stato individuato un frutteto "campione", in cui effettuare dei rilievi periodici, nell'azienda Berta Paolo di Prascorsano-TO. L'appezzamento considerato contava 167 piante dell'età di 7 anni, appartenenti a quattro cultivar differenti (Golden Delicious, Renetta del Canada, Royal Gala e Ozark Gold), innestate su portinnesto M7, con forma di allevamento a "doppio Y".

In questo frutteto si sono succeduti una serie di sopralluoghi per valutare se e come il quadro sintomatologico, a carico di ogni singola pianta, evolvesse nel corso della stagione. A tal fine ogni pianta osservata è stata numerata. I rilievi sono coincisi con le date del 26/06/02, del 13/09/02 e il

03/03/03, corrispondenti alle fasi fenologiche di frutto noce, pre-raccolta e riposo vegetativo. Un quarto rilievo è stato eseguito alla ripresa vegetativa. Anche per il frutteto campione è stata compilata una scheda sintetica e conoscitiva dell'azienda.

### *Rilievi sulla presenza stagionale degli insetti vettori*

Uno degli obiettivi della sperimentazione era quello di ampliare le conoscenze relative gli insetti vettori di AP, in particolare evidenziare quali specie siano presenti in Piemonte e come si svolga il loro ciclo biologico in questo ambiente. Durante il monitoraggio, si è posta particolare attenzione anche alla vegetazione spontanea, presente ai margini degli appezzamenti coltivati, nel tentativo di chiarire una questione ancora incerta, ossia su quali specie vegetali gli adulti svernanti trovino rifugio durante l'inverno, data la loro accertata assenza sulla coltura del melo.

A questo scopo, parallelamente al lavoro di monitoraggio, esteso ad un ampio territorio, è stata scelta l'azienda Fenoglio Pietro e Marco nel comune di Prascorsano, perché chiaramente sintomatica, entro cui effettuare tutte le osservazioni relative agli insetti vettori.

### *Campionamento mediante trappole cromotropiche gialle*

A cominciare dal 2 maggio 2002, nell'azienda Fenoglio, si è proceduto al posizionamento di 10 trappole cromotropiche collanti gialle, sostituite ogni 10 giorni fino al 5 luglio, sulla base di uno schema di distribuzione prefissato. L'altezza dal suolo delle trappole era di circa 1.6-1.8 metri. Ad ogni sostituzione le trappole

prelevate dai rami venivano avvolte in pellicola trasparente, numerate, perché la loro posizione fosse nota, e conservate in frigorifero fino alla consegna, realizzata in giornata, ai laboratori del Di.Va.Pra. dove venivano valutate le specie di insetti catturati ed in particolare il numero di psille appartenenti alla specie *C. melanoneura*.

### *Campionamento mediante scuotimento meccanico*

A partire dal 2 maggio, campionamenti mediante scuotimento meccanico dei rami sono stati eseguiti ogni 10 giorni, fino al 12 giugno. Dieci piante sono state scelte a caso e per ogni pianta venivano dati dieci colpi con un bastone, tenendo sotto i rami un vassoio di plastica bianco dove cadevano le psille. Questa tecnica di campionamento rappresenta un utile supporto alle trappole cromotropiche, soprattutto nei periodi in cui è più ridotta l'attività di volo degli insetti. Inoltre tale tecnica permette di raccogliere insetti vivi da destinare a successive prove di laboratorio, quali per esempio le indagini diagnostiche. Gli insetti sono quindi stati raccolti mediante aspiratore entomologico e portati in laboratorio per essere sottoposti a diagnosi molecolare.

### *Raccolta di campioni di foglie da piante di melo sintomatiche*

Per accertare l'effettiva presenza del fitoplasma agente dell'Apple Proliferation nel meleto considerato, campioni di foglie sono stati prelevati da 10 piante mostranti sintomi di AP, a fine estate, quando maggiore è la concentrazione dei fitoplasmii nei meli, e portati al Di.Va.P.R.A. per essere sottoposti alle indagini molecolari.

### *Osservazioni di laboratorio*

Il materiale consegnato in laboratorio è stato prima sottoposto ad un'osservazione mirante a stabilire il numero, l'età ed il sesso degli individui catturati di *C. melanoneura* (unico vettore rintracciato), e successivamente alle indagini molecolari necessarie per evidenziare la positività dei vettori al fitoplasma agente causale di AP. Le indagini di laboratorio hanno previsto l'estrazione del DNA totale sia dagli insetti sia dai campioni di foglie di melo, seguendo un protocollo precedentemente descritto da Marzachi *et al.* (1998) per quanto riguarda gli insetti e da Ahrens, Seemüller (1992) per quanto riguarda le piante (Marzachi *et al.*, 1998; Ahrens, Seemüller, 1992). Successivamente il DNA del fitoplasma è stato amplificato mediante PCR (reazione di amplificazione genica a catena).

### *Estrazione di DNA da insetti*

Gli insetti sono stati pestati in gruppi da 5 individui ciascuno, quando possibile, in provette da 1,5 ml per mezzo di micropestelli in presenza di un tampone di estrazione (CTAB) preriscaldato a 60°C. La sospensione è stata incubata a 60°C per 30 min, quindi centrifugata al fine di eliminare il residuo solido. Il surnatante è stato trasferito in nuove provette e addizionato con un volume di cloroformio isoamilalcol. Dopo un'agitazione di 20 min successiva centrifugazione a temperatura ambiente per 5 min, la fase acquosa è stata trasferita in nuove provette e il DNA è stato precipitato con 1 volume di isopropanolo freddo in centrifuga refrigerata, lavato con etanolo 70% ed asciugato in *vacuo*. Infine il DNA è stato risospeso in 20 µl di acqua deionizzata sterile e posto in congelatore a -20°C per la sua conservazione.

### *Estrazione di DNA da vegetale*

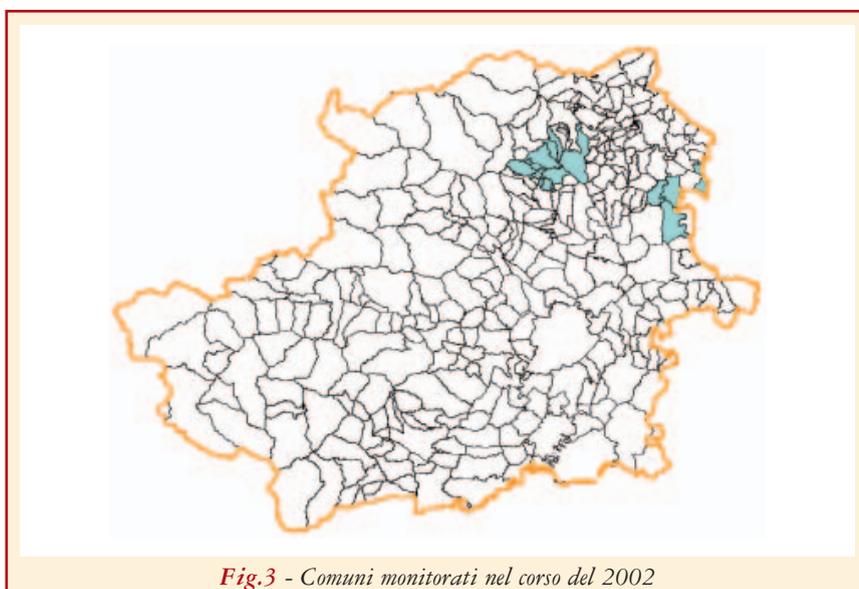
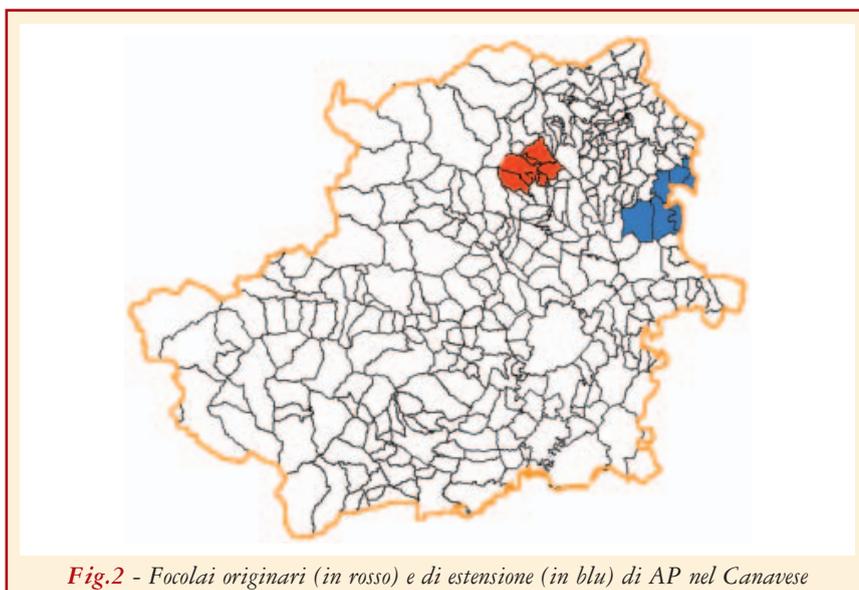
Per quanto riguarda l'estrazione del DNA da vegetale, per ciascun campione, 1 g di nervature di foglie di melo, allo scopo di concentrare il tessuto vascolare e di conseguenza anche il floema che ospita i fitoplasmii, è stato prelevato, pestato in mortaio con azoto liquido e addizionato con un primo tampone di estrazione (*Grinding Buffer*). Dopo filtrazione della sospensione, essa è stata trasferita in provette da 13,5 ml e centrifugata per 30 min a 4°C. La fase liquida è stata eliminata e al pellet rimasto è stato addizionato un secondo tampone di estrazione (CTAB) preriscaldato a 60°C. Dopo un'incubazione di 30 min a 60°C, alla sospensione è stato aggiunto un volume di cloroformio-isoamilalcol. Dopo un'agitazione di 20 min successiva centrifugazione a temperatura ambiente, la fase acquosa è stata prelevata e trasferita in una nuova provetta dove il DNA è stato fatto precipitare con 0,7 volumi di isopropanolo a -20°C per 30 min. In seguito a centrifugazione per 30 min a 4°C, il surnatante è stato scartato e il pellet di DNA è stato lavato con etanolo, trasferito in una provetta da 1,5 µl ed asciugato in *vacuo*. Infine il DNA è stato risospeso in 100 ml di acqua sterile e posto in congelatore a -20°C per la sua conservazione.

### *Amplificazione del DNA (PCR)*

La tecnica della PCR prevede l'utilizzo di primer la cui funzione è di ibridarsi a un tratto specifico del DNA (appartenente al fitoplasma) con sequenza complementare, creando un tratto di DNA a doppia elica che sarà riconosciuto come substrato della successiva reazione di polimerizzazione. Per la ricerca del fitoplasma agente dell'apple proliferation, sono stati utilizzati

prima dei primer generici per i fitoplasmii (P1/P7) (Schneider *et al.*, 1995) in PCR diretta e successivamente dei primer specifici per il gruppo AP (fO1/rO1) (Lorenz *et al.*, 1995) in PCR indiretta. I prodotti di amplificazione ottenuti con la PCR diretta sono stati diluiti alla concentrazione finale di 1:40 con acqua deionizzata sterile in modo da essere impiegati

come templati nell'amplificazione indiretta con fO1/rO1. Per visualizzare i frammenti di DNA ottenuti con la PCR, gli amplificati sono stati sottoposti ad elettroforesi in gel di agarosio all'1%, seguita da colorazione con bromuro di etidio. Il gel è stato quindi osservato e fotografato grazie ad un transilluminatore con lampada ad UV.



## Risultati

### Monitoraggio

L'emissione incontrollata di germogli laterali sui rami dell'anno è il sintomo rilevato con maggior frequenza, in particolare sulle branche più interne della vegetazione o, a livello del colletto, a carico dei polloni.

Sintomi di AP sono stati trovati in tutti i frutteti censiti, l'incidenza della malattia, comunque, è risultata grave in soli tre meleti localizzati nei comuni di Prascorsano e Valperga. Nella maggior parte dei casi la malattia si è manifestata in forma lieve o media (Tab.1).

Nel 75% dei frutteti censiti è stato rilevato un accrescimento delle stipole superiore alla norma. Gli altri sintomi sono comparsi con minore incidenza (Tab.2).

È stato osservato che la manifestazione dei sintomi diventava più evidente con l'avanzamento della stagione, in particolare in prossimità della raccolta, e che esiste una diversa risposta alla malattia nelle differenti cultivar (ad esempio le cv Golden delicious e Renetta del Canada hanno manifestato sintomi più evidenti).

Tab.1- Incidenza della malattia nei frutteti censiti

Comune	n° Frutteti	Classe di danno
Borgo d'Ale	2	lieve
Candia	2	lieve
Canischio	1	media
Castellamonte	3	lieve
	1	media
Chiesa Nuova	1	lieve
Cossano	1	media
Cuorgnè	1	lieve
	1	media
Maglione	4	lieve
	1	media
Mazzè	2	lieve
Pertusio	3	lieve
Prascorsano	2	lieve
	1	media
	2	grave
Pratiglione	3	media
S. Colombano	1	media
Valperga	3	lieve
	2	media
	1	grave
Vische	1	lieve
<b>Totale Frutteti</b>	<b>39</b>	

**Tab.2- Incidenza dei sintomi osservati**

Sintomo	% Ricontrata sul totale dei frutteti
Emissione incontrollata di germogli laterali sui rami dell'anno (scopazzi)	90%
Ripresa vegetativa anticipata	n.r.
Formazione di rosette di foglie all'apice dei germogli	25%
Fioriture fuori stagione	15%
Foglie piccole, allungate e con i margini seghettati	20%
Stipole di dimensioni superiori alla norma	75%
Arrossamenti degli apici vegetativi	15%
Frutti di dimensioni inferiori alla norma con picciolo allungato e colorazione che permane verde	12.5%
Affastellamento vegetativo dell'intera pianta	25%

### *Rilievi sintomatologici nel frutteto campione*

Nel corso del primo rilievo, effettuato il 26 giugno allo stadio fenologico di frutto noce, le piante infette sono state rilevate grazie alla presenza diffusa di stipole di dimensioni superiori rispetto alla norma e, secondariamente, per la presenza di scopazzi.

Il secondo rilievo del 13 settembre, in fase ormai di pre-raccolta, ha evidenziato un quadro sintomatologico più vario: gli apici vegetativi degli scopazzi, presenti su un numero maggiore di piante, mostravano arrossamenti e foglie di piccole dimensioni con margine seghettato. Di seguito si fornisce un quadro dei sintomi riscontrati nel corso dei due rilievi (**Tab.3**).

**Tab.3- Numero di piante risultate sintomatiche, nelle due diverse fasi fenologiche, nel frutteto campione**

Sintomi	Frutto Noce (26/6)	Preraccolta (13/9)
Emissione incontrollata di germogli laterali sui rami dell'anno (scopazzi)	18	33
Ripresa vegetativa anticipata	–	–
Formazione di rosette di foglie all'apice dei germogli	0	0
Fioriture fuori stagione	0	0
Foglie piccole, allungate e con i margini seghettati	1	32
Stipole di dimensioni superiori alla norma	38	34
Arrossamenti degli apici vegetativi	0	18
Frutti di dimensioni inferiori alla norma con picciolo allungato e colorazione che permane verde	0	0
Affastellamento vegetativo dell'intera pianta	5	0

### Rilievi sugli insetti vettori

Dall'osservazione degli insetti catturati attraverso le trappole cromotropiche gialle e lo scuotimento meccanico dei rami è risultato che gli adulti di *C.melanoneura* campionati appartenevano tutti alla nuova

generazione e sono sempre stati presenti in numero limitato, probabilmente perché a maggio gran parte della popolazione neosfarfallata era già migrata su ospiti alternativi al melo per l'estivazione e il successivo svernamento su altre piante ancora sconosciute (Tab.4 e Tab.5).

**Tab.4- Catture di *Cacopsylla melanoneura* mediante trappole cromotropiche gialle** (legenda: m-maschio; f-femmina; n-ninfa)

DATA	TRAPPOLA									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
13 maggio	1f+1m	0	0	0	0	1f	0	0	0	0
24 maggio	0	2f+1m	0	1f	0	1f+1m	0	0	1m	2m
3 giugno	0	0	0	2f+1m	0	1m	1m	0	1f	0
12 giugno	1m	1f	0	1f+5m	0	2m	2f+13m	2m	6m	1f+1m
24 giugno	0	0	1f	0	0	0	0	0	0	0

**Tab.5- Catture di *Cacopsylla melanoneura* mediante scuotimento meccanico dei rami di melo** (legenda: m-maschio; f-femmina; n-ninfa)

DATA	PIANTA									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
13 maggio	1m	1m	1n	0	0	3m+4n	1f+2m+3n	3f+1m	1f+1m	2f+1m
23 maggio	0	1m+1n	1m	1m+1n	0	0	0	0	1n	0
03 giugno	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13 giugno	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Degli otto campioni di psille, raccolti mediante la tecnica dello scuotimento meccanico dei rami e sottoposti ad analisi molecolare mediante PCR con primer specifici per i fitoplasmidi del gruppo AP, solamente uno, formato da cinque adulti neosfarfallati, è risultato positivo.

### Analisi sui campioni vegetali

Tutti i dieci campioni di vegetale raccolti sono risultati positivi ad AP in seguito a PCR con primer specifici per i fitoplasmidi del gruppo AP.

*Sintomatologia osservata*



*Fig.4 - Emissione incontrollata di germogli laterali sui rami dell'anno (scopazzi)*



*Fig.5 - Formazione di rosette di foglie all'apice dei germogli*



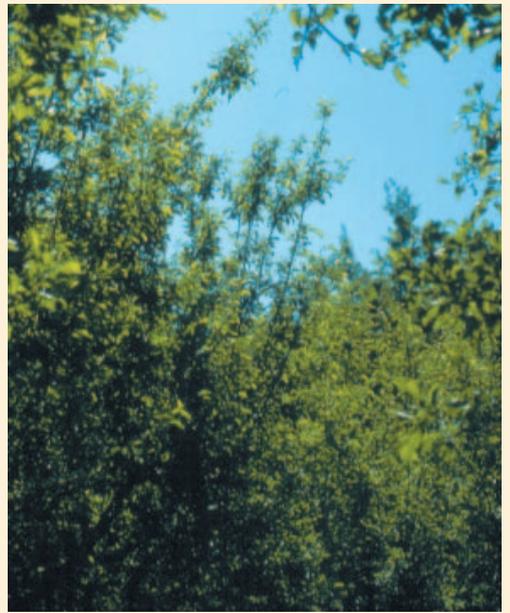
*Fig.6 - Fioriture fuori stagione*



*Fig.7 - Stipole di dimensioni superiori alla norma*



*Fig.8 - Frutti di dimensioni inferiori con picciolo allungato*



*Fig.9 - Affastellamento vegetativo dell'intera pianta*

## BIBLIOGRAFIA

---

- AHRENS U., SEEMÜLLER E., 1992. Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology* 82: 828-832.
- ALMA A., NAVONE P., VISENTIN C., ARZONE A., BOSCO D., 2000. Rilevamento di fitoplasmi di "Apple proliferation" in *Cacopsylla melanoneura* (Förster) (Homoptera Psyllidae). *Petria* 10: 141-142.
- CULATTI P. Scopazzi del melo. Schede Fitosanitarie Regione Lombardia.  
[http://www.agricoltura.regione.lombardia.it/admin/rla\\_Documenti/1-259/scopazzi.pdf](http://www.agricoltura.regione.lombardia.it/admin/rla_Documenti/1-259/scopazzi.pdf)
- LORENZ K.H., SCHNEIDER B., AHRENS U., SEEMÜLLER E., 1995. Detection of the Apple Proliferation and Pear Decline Phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and non ribosomal DNA. *Phytopathology* 85: 771-776.
- MARZACHÌ C., VERATTI F., BOSCO D., 1998. Direct PCR detection of phytoplasmas in experimentally infected insects. *Annals of Applied Biology* 133: 45-54.
- SCHNEIDER E., SEEMÜLLER E., SMART C.D., KIRKPATRICK B.C., 1995. Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organism or phytoplasmas. In Razin S., J.G. Tully (eds.). *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasma*, Vol I, pp. 369-380. Academic Press, San Diego.
- TEDESCHI R., BOSCO D., ALMA A., 2002. Population dynamics of *Cacopsylla melanoneura* (Homoptera: Psyllidae), a vector of Apple Proliferation in northwestern Italy. *Journal of Economic Entomology* 95 (3): 544-551.