

# SCOPAZZI DEL MELO

STATO ATTUALE DELLA RICERCA

---

# APFELTRIEBSUCHT

AKTUELLER STAND DER FORSCHUNG

A cura di // Herausgegeben von

KATRIN JANIK

DANA BARTHEL

TIZIANA OPPEDISANO

GIANFRANCO ANFORA



FONDAZIONE  
EDMUND MACH



Versuchszentrum  
Centro di Sperimentazione  
Research Centre

**LAIBURG**  
NATURE & SCIENCE: HAND IN HAND

# SCOPAZZI DEL MELO

STATO ATTUALE DELLA RICERCA

---

# APFELTRIEBSUCHT

AKTUELLER STAND DER FORSCHUNG

A cura di // Herausgegeben von

KATRIN JANIK

DANA BARTHEL

TIZIANA OPPEDISANO

GIANFRANCO ANFORA



FONDAZIONE  
EDMUND MACH



Versuchszentrum  
Centro di Sperimentazione  
Research Centre

NATURE & SCIENCE: HAND IN HAND

Scopazzi del melo : stato attuale della ricerca = Apfeltriebsucht : aktueller Stand der Forschung / a cura di = herausgegeben von Katrin Janik ... [et al.]. - San Michele all'Adige (TN) : Fondazione Edmund Mach ; Laimburg : Ora (BZ) : Centro di Sperimentazione Laimburg, 2020. - 153 p. : i ll., tab. ; 26 cm.

ISBN: 9788878430532

1. Melo - Malattie da fitoplasmi I. Janik, Katrin II. Fondazione Edmund Mach III. Centro di sperimentazione Laimburg 634.11932

Il presente lavoro è stato svolto nell'ambito dei progetti APPL2.0, APPLClust, APPLIII e SCOPAZZI\_FEM ed è stato finanziato dalla Provincia Autonoma di Bolzano - Alto Adige, dal Consorzio Mele Alto Adige e dall'Associazione Produttori Ortofrutticoli Trentini (APOT). // Die Arbeiten wurden im Rahmen der Projekte APPL2.0, APPLClust, APPLIII und SCOPAZZI-FEM durchgeführt und von der Autonomen Provinz Bozen - Südtirol, Italien, dem Südtiroler Apfelkonsortium und dem Verband der Obst- und Gemüseerzeuger im Trentino (APOT) finanziert.



## **SCOPAZZI DEL MELO - STATO ATTUALE DELLA RICERCA APFELTRIEBSUCHT - AKTUELLER STAND DER FORSCHUNG**

© 2020 Fondazione Edmund Mach, Via E. Mach 1, 38098 San Michele all'Adige (TN) - Centro di Sperimentazione Laimburg/Versuchszentrum Laimburg, Laimburg 6, 39040 Ora/Auer (BZ).

È vietata la riproduzione con qualsiasi mezzo essa venga effettuata.

### **TESTI // TEXTE**

Dana Barthel, Stefanie Fischnaller, Thomas Letschka, Katrin Janik, Cecilia Mittelberger, Sabine Öttl, Bernd Panassiti - Centro di Sperimentazione Laimburg, Ora (Italia) // Versuchszentrum Laimburg, Auer (Italien)

Gino Angeli, Mario Baldessari, Pier Luigi Bianchedi, Andrea Campisano, Laura Tiziana Covelli, Gastone Dallago, Claudio Ioriatti, Valerio Mazzoni, Mirko Moser, Federico Pedrazzoli, Omar Rota-Stabelli, Tobias Weil - Fondazione Edmund Mach, San Michele all'Adige (Italia) // Fondazione Edmund Mach, San Michele all'Adige (Italien)

Tiziana Oppedisano - Fondazione Edmund Mach, San Michele all'Adige (Italia) / Università degli Studi del Molise // Fondazione Edmund Mach, San Michele all'Adige (Italien) / Università degli Studi del Molise (Italien)

Gianfranco Anfora - Centro Agricoltura Alimenti Ambiente (C3A), Università degli Studi di Trento / Centro Ricerca e Innovazione, Fondazione Edmund Mach, San Michele all'Adige (Italia) // Centro Agricoltura Alimenti Ambiente (C3A), Università degli Studi di Trento, San Michele all'Adige (Italien) / Centro Ricerca e Innovazione, Fondazione Edmund Mach, San Michele all'Adige (Italien)

Wolfgang Jarausch - AlPlanta, Neustadt an der Weinstraße (Germania) // AlPlanta, Neustadt an der Weinstraße (Deutschland)

Josef Österreicher, Michael Unterthurner - Centro di consulenza per la frutticoltura dell'Alto Adige, Lana-BZ (Italia) // Südtiroler Beratungsring für Obst- und Weinbau, Lana-BZ (Italien)

Wolfgang Schweigkofler - Dominican University of California, San Rafael California (USA) // Dominican University of California, San Rafael, Kalifornien (USA)

Rosemarie Tedeschi - DISAFA - Università degli Studi di Torino, Torino (Italia) // DISAFA Università degli Studi di Torino, Turin (Italien)

Hannes Schuler - Libera Università di Bozen-Bolzano, Bolzano (Italia) // Freie Universität Bozen, Bozen (Italien)

### **CURA E REVISIONE TESTI // BETREUUNG DER TEXTERSTELLUNG UND REVISION**

Katrin Janik, Dana Barthel, Tiziana Oppedisano, Gianfranco Anfora

### **TRADUZIONI // ÜBERSETZUNG**

(EN>IT) Mattia Tabarelli, Tiziana Oppedisano

(EN>DE) Studio Traduc - Bolzano (Claudia Lenz), Dana Barthel, Katrin Janik

### **COORDINAMENTO EDITORIALE // REDAKTIONELLE KOORDINATION**

Erica Candioli

### **REALIZZAZIONE GRAFICA ESECUTIVA // GRAFISCHE UMSETZUNG**

IDESIA - [www.idesia.it](http://www.idesia.it)



# 2

L'AGENTE CAUSALE  
DEGLI SCOPAZZI  
DEL MELO

DER ERREGER  
DER APFELTRIEBSUCHT

---

Katrin Janik, Sabine Öttl, Federico Pedrazzoli,  
Omar Rota-Stabelli, Rosemarie Tedeschi,  
Thomas Letschka



## Tassonomia, filogenesi e caratterizzazione molecolare del fitoplasma AP

Il fitoplasma AP è tassonomicamente definito come '*Candidatus Phytoplasma mali*' (Seemüller e Schneider 2004). Lo stato provvisorio di '*Candidatus*' è usato perché questo microrganismo non può essere coltivato e i postulati di Koch non possono essere soddisfatti. '*Ca. P. mali*' appartiene alla famiglia delle Acholeplasmataceae (ordine Acholeplasmatales) dei Mollicutes, una grande classe di batteri contenenti vari agenti patogeni inclusi gli *Spiroplasma* (Entomoplasmale) (Oshima *et al.* 2013; Siewert *et al.* 2014). Come tutti gli altri membri della classe Mollicutes, il fitoplasma AP è caratterizzato dall'assenza di una parete cellulare e da un ciclo vitale parassitario obbligatorio nel floema della pianta che ostacola la sua coltura *in vitro*. Il genere '*Candidatus Phytoplasma*' ha attraversato una grande radiazione genetica, che ha generato almeno 40 specie diverse che colpiscono una varietà di piante ospiti; i tempi di questa radiazione sono ancora sconosciuti, così come l'epoca della diversificazione del fitoplasma da altre Acholeplasmataceae (Kube *et al.* 2012). Sebbene esista una certa specificità tra i fitoplasmata e i loro ospiti, i fitoplasmata della stessa specie possono occasionalmente infettare piante diverse, rendendo l'epidemiologia estremamente complessa (Lee *et al.* 2000). Il fitoplasma AP è strettamente correlato al '*Candidatus Phytoplasma pyri*', l'agente

## Taxonomie, Phylogenie und molekulare Charakterisierung von AP-Phytoplasmen

AP-Phytoplasmen werden taxonomisch als '*Candidatus Phytoplasma mali*' definiert (Seemüller und Schneider 2004). Der vorläufige Status '*Candidatus*' wird verwendet, da diese Mikroorganismen unkultivierbar sind und daher die Koch'schen Postulate nicht erfüllt werden können. Das Phytoplasma '*Ca. P. mali*' gehört zur Familie der Acholeplasmataceae (Ordnung Acholeplasmatales) der Klasse Mollicutes. Mollicutes stellen eine große Klasse von Bakterien dar, die verschiedene Krankheitserreger umfasst, darunter auch Spiroplasmata (Entomoplasmatale) (Oshima *et al.* 2013; Siewert *et al.* 2014). Wie alle anderen Mitglieder der Klasse Mollicutes besitzt das AP-Phytoplasma keine Zellwand und zeichnet sich darüber hinaus durch seinen obligatorischen parasitären Lebenszyklus innerhalb des Insektes und im Phloem der Pflanze aus. Diese Eigenschaften behindern maßgeblich die Kultivierbarkeit von '*Ca. P. mali*'. Die Gattung '*Candidatus Phytoplasma*' erlebte eine große genetische Diversifizierung, die mindestens 40 verschiedene phytopathogene Arten hervorbrachte. Der Zeitpunkt, wann es zu dieser genetischen Diversifizierung kam ist unbekannt, ebenso wie die evolutionäre Abspaltung der Phytoplasmen von anderen Acholeplasmataceae (Kube *et al.* 2012). Obwohl es eine gewisse Spezifität zwischen Phytoplasmen und ihren Wirten gibt, können Phytoplasmen derselben

causale del deperimento del pero; questi due sono a loro volta sono strettamente correlati al '*Candidatus Phytoplasma prunorum*' (che causa il Giallume europeo delle Drupacee (European Stone Fruit Yellows, ESFY)) e più a distanza al '*Candidatus Phytoplasma spartii*' (Seemüller e Schneider 2004). Questi quattro fitoplasmi appartengono al gruppo del fitoplasmi 16SrX (Lee *et al.* 1998; Marcone *et al.* 2004).

'*Ca. P. mali*' è caratterizzato da un piccolo genoma organizzato in un unico cromosoma lineare. Il genoma differisce in molti aspetti da quello di altre specie di fitoplasmi (Kube *et al.* 2008) ed è geneticamente altamente dinamico con un basso contenuto di GC (Jarusch *et al.* 2000; Bai *et al.* 2006; Sugio e Hogenhout 2012). I sistemi di classificazione dei fitoplasmi erano basati sulla diversità di sequenze di rRNA 16S. I primer che amplificano specificamente i geni rRNA 16S del fitoplasma AP del sono stati ampiamente descritti e utilizzati per la diagnosi (Deng e Hiruki 1991; Ahrens e Seemüller 1992; Lee *et al.* 1993; Namba *et al.* 1993; Schneider *et al.* 1993; Gundersen e Lee 1996). Un sistema di classificazione del fitoplasma comunemente usato comporta l'analisi del pattern RFLP di un amplicone di rRNA 16S (Lee *et al.* 1998): basandosi su questa classificazione, il fitoplasma AP appartiene al sottogruppo 16SrX-A come sopra descritto.

Discriminare tra le varianti genetiche di AP è un prerequisito fondamentale per studiare i focolai di AP nelle diverse regioni europee. Una classificazione del fitoplasma AP basata sull'analisi di più geni

---

Art gelegentlich verschiedene Pflanzen infizieren, was die Epidemiologie äußerst komplex macht (Lee *et al.* 2000). Das AP-Phytoplasma ist eng verwandt mit '*Candidatus Phytoplasma pyri*', dem Erreger des Birnenverfalls. Jene beiden wiederum sind näher verwandt mit '*Candidatus Phytoplasma prunorum*' (verursacht Europäische Steinobstvergilbung) und weiter entfernt mit '*Candidatus Phytoplasma spartii*' (Seemüller und Schneider 2004). Diese vier Phytoplasmen gehören zur 16SrX Phytoplasmengruppe (Lee *et al.* 1998; Marcone *et al.* 2004). '*Ca. P. mali*' zeichnet sich durch sein kleines Genom aus, das in einem einzigen, linearen Chromosom angeordnet ist. Das Genom unterscheidet sich hinsichtlich mehrerer Aspekte von dem anderer Phytoplasmaarten (Kube *et al.* 2008). Es ist genetisch sehr variabel und verfügt über einen sehr niedrigen GC-Gehalt (Jarusch *et al.* 2000; Bai *et al.* 2006; Sugio und Hogenhout 2012). Die aktuellen Phytoplasma-Klassifizierungssysteme basieren auf 16S rRNA-Sequenzdiversität. Primer, die spezifisch Phytoplasmen 16S rRNA-Gene amplifizieren, wurden umfassend beschrieben und werden zu Diagnosezwecken verwendet (Deng und Hiruki 1991; Ahrens und Seemüller 1992; Lee *et al.* 1993; Namba *et al.* 1993; Schneider *et al.* 1993; Gundersen und Lee 1996). Ein häufig verwendetes Phytoplasma-Klassifizierungssystem ist die Analyse des Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) Musters eines 16S rRNA-Amplikons (Lee *et al.* 1998): basierend auf dieser Klassifikation gehört das AP-Phytoplasma wie bereits be-

(anche non ribosomali) e con un potere discriminante più elevato è stata messa a punto. Questa tipizzazione molecolare permette una più chiara differenziazione tra i diversi ceppi all'interno di una specie di fitoplasma (Smart *et al.* 1996; Schneider *et al.* 1997; Jarausch *et al.* 2000; Danet *et al.* 2011; Baric *et al.* 2011a; Martini e Lee 2013; Seemüller *et al.* 2013; Šeruga Musić e Skorić 2013; Valiunas *et al.* 2013). In particolare, la tipizzazione multilocus delle sequenze (MLST), un metodo basato sull'analisi delle variazioni in più siti genomici, consente l'analisi delle relazioni intra- e inter-specie (Danet *et al.* 2011; Casati *et al.* 2011; Janik *et al.* 2015). Con questo metodo, vengono analizzate diverse aree genetiche del genoma del fitoplasma (loci) e viene generato un codice di tipizzazione specifico per ceppo.

La capacità di rilevare una maggiore diversità genetica consente di studiare le distribuzioni geografiche di diversi ceppi di fitoplasma, identificare infezioni miste e valutare virulenze e associazioni tra alcuni ceppi e insetti vettori. Il vantaggio degli studi MLST consiste nella possibilità di una tipizzazione di dettaglio mediante l'analisi e il confronto di sequenze in loci diversi. Uno svantaggio, tuttavia, è che, anche se possono essere analizzati i processi evolutivi, molti programmi di analisi MLST comuni (ad esempio eBURST) non prendono in considerazione le probabilità differenziali di alcuni eventi mutazionali in gruppi di geni diversi (ad esempio considerare le funzioni conservate/non conservate). Ad esempio, Seemüller e colleghi (Seemüller *et al.* 2010b; 2011b)

---

schrieben zur 16SrX-A-Subgruppe.

Der Vergleich genetischer Varianten des AP-Phytoplasmas ist wichtig um Ausbrüche der Apfeltriebsucht in verschiedenen europäischen Regionen zu untersuchen und miteinander zu vergleichen. Eine Klassifizierung von AP-Phytoplasmen basierend auf der Analyse mehrerer, variablerer, u.a. nicht-ribosomaler Gene wurde entwickelt. Diese molekulare Typisierung erlaubt eine deutlichere Unterscheidung zwischen verschiedenen Stämmen innerhalb einer Phytoplasmaart (Smart *et al.* 1996; Schneider *et al.* 1997; Jarausch *et al.* 2000; Danet *et al.* 2011; Baric *et al.* 2011a; Martini e Lee 2013; Seemüller *et al.* 2013; Šeruga Musić e Skorić 2013; Valiunas *et al.* 2013). Insbesondere die Multilokus-Sequenztypisierung (MLST) ermöglicht einen detaillierten Vergleich zwischen verschiedenen Phytoplasmaarten und -stämmen (Danet *et al.* 2011; Casati *et al.* 2011; Janik *et al.* 2015). Bei dieser Methode werden mehrere verschiedene genetische Bereiche des Phytoplasmagenoms (Loci) analysiert und ein Stamm-spezifischer Typisierungscode erstellt. Die Fähigkeit, genetisch unterschiedliche Phytoplasma Stämme zu bestimmen, ermöglicht es die geografische Verteilung dieser Stämme zu untersuchen. Darüber hinaus können Mischinfektionen innerhalb von Pflanzen und Tieren untersucht und die Virulenz einzelner Stämme bestimmt werden. Außerdem kann die Assoziation bestimmter Phytoplasmenstämme mit ihren jeweiligen Insektenvektoren untersucht werden. Der Vorteil von MLST-Studien liegt in der Möglichkeit einer

hanno usato i geni *hflB* e *imp* per proporre un'associazione tra alcuni ceppi e la virulenza. Si ipotizza un ruolo di *hflB* e *imp* nella virulenza e gli autori hanno mostrato una correlazione tra alcune varianti nella sequenza del gene *hflB* e la virulenza del ceppo. Tuttavia, il ruolo biologico delle proteine codificate durante l'infezione da fitoplasmi non è stato ancora completamente compreso (si veda il capitolo "Aspetti molecolari dello sviluppo dei sintomi nel melo"). Mentre questi due marcatori molecolari si sono rivelati altamente polimorfici, SNP (mutazioni puntiformi) stabili sono stati trovati nel gene della nitroreduktasi che ha portato alla definizione dei sottotipi comunemente usati di ceppi "AT-1", "AT-2" e "AP" (Jarausch *et al.* 2000). Un altro approccio di tipizzazione basato sul rRNA 16S e sul gene *rpl22* (che codifica L22) ha rivelato una correlazione insetto (vettore) - ceppo in Alto Adige (Italia settentrionale) (Baric *et al.* 2011a). *Cacopsylla melanoneura* ospitava un ceppo di fitoplasma AP AT-1 e *C. picta* ospitava AT2 (Baric *et al.* 2010; 2011a). I risultati hanno inoltre mostrato un pattern di distribuzione spazio-temporale: il ceppo AT-1 era prevalente prima del 2005 in questa regione, mentre il ceppo AT-2 è stato rilevato solo nel 2006 per la prima volta, cioè due anni dopo la prima scoperta di *C. picta* come vettore (Baric *et al.* 2011a). Poco dopo la comparsa di *C. picta*, si è manifestato un forte focolaio di AP, con picco nel 2006 (si veda il capitolo "Italia del Nord - Alto Adige, Trentino, Piemonte e Valle d'Aosta"). La trasmissione del fitoplasma AP da parte di *C. picta* è stata dimo-

---

fein abgestimmten Typisierung durch Analyse und Vergleich von Sequenzen verschiedener Loci. Ein Nachteil besteht jedoch darin, dass viele gängige MLST-Analyseprogramme (z. B. eBURST) unterschiedliche Wahrscheinlichkeiten bestimmter Mutationsereignisse (z. B. in Genen mit konservierter oder unkonservierter Funktion) verschiedener Gengruppen nicht berücksichtigen. Seemüller *et al.* (2010b; 2011b) nutzten die Gene *hflB* und *imp*, um einen Zusammenhang zwischen bestimmten Stämmen und der Virulenz herzustellen. Es wird angenommen, dass *hflB* und *imp* bei der Virulenz eine Rolle spielen, und die Autoren zeigten eine Korrelation zwischen bestimmten Sequenz-Varianten des *hflB*-Gens und der Virulenz des Stammes auf. Die biologische Rolle der kodierten Proteine bei einer Phytoplasmainfektion ist jedoch noch nicht vollständig geklärt (siehe Kapitel „Molekulare Aspekte der Symptomentwicklung beim Apfelbaum“). Während sich diese beiden molekularen Marker als hochpolymorph erwiesen, wurden im Nitroreduktase-Gen stabile SNPs (Einzelnukleotid-Polymorphismus, englisch single nucleotide polymorphism) gefunden, die zur weit verbreiteten Subtypdefinition der „AT-1“, „AT-2“ und „AP“ Stämme führten (Jarausch *et al.* 2000). Ein weiterer Typisierungsansatz, der auf dem 16S rRNA- und dem *rpl22*-Gen (kodierend L22) basiert, ergab eine Insekten (Vektor)-Stamm-Korrelation in Südtirol (Norditalien) (Baric *et al.* 2011a). *C. melanoneura* trägt den AP Phytoplasma Stamm AT-1 und *C. picta* den Stamm AT-2 (Baric *et al.* 2010a; 2011a). Die Ergebnisse zeigten ferner ein räumlich-zeitliches



strata da diversi studi indipendenti in Italia e Germania (Frisinghelli *et al.* 2000; Seemüller *et al.* 2004; Jarausch *et al.* 2004a; Carraro *et al.* 2008; Oppedisano *et al.* 2019b). È interessante notare che le prove di trasmissione del fitoplasma AP con *C. melanoneura* sono riuscite solo nell'Italia nord-occidentale e nel Trentino (Tedeschi *et al.* 2003; Tedeschi e Alma 2004; Mattedi *et al.* 2008c; Oppedisano *et al.* 2019b) ma sono fallite in Germania (Seemüller *et al.* 2004; Mayer *et al.* 2009). Questi risultati hanno portato all'ipotesi che alcuni sottotipi di fitoplasmi AP potrebbero essere specificamente associati a determinate popolazioni di *C. melanoneura* in determinate regioni (Mayer *et al.* 2009). Pertanto, i dati di tipizzazione genetica possono aiutare a spiegare focolai locali e periodici di AP e la loro associazione a determinati insetti. Un approccio futuro potrebbe consistere nel combinare i dati provenienti dalla tipizzazione del fitoplasma, dall'associazione ceppo-vettore, dalla genetica delle popolazioni di insetti e dal loro comportamento per sviluppare modelli e elaborare una previsione di diffusione dell'AP. Ciò richiede in effetti una profonda conoscenza dei parametri che influenzano il sistema biologico altamente complesso di diffusione dell'AP. L'applicazione di conoscenze derivanti dalla tipizzazione molecolare e dall'analisi delle sequenze potrebbe ulteriormente rivelare i fattori coinvolti nella virulenza, l'associazione coi vettori e, infine, consentire una sorta di tracciamento delle fonti molecolari per individuare la fonte dell'infezione. Qualsiasi approccio di tipizzazione è limitato al tipo di

---

Verteilungsmuster: Der AT-1-Stamm war vor 2005 in Südtirol weit verbreitet, während der AT-2-Stamm 2006 zum ersten Mal nachgewiesen wurde, d. h. zwei Jahre nach der ersten Entdeckung von *C. picta* (Baric *et al.* 2011a). Kurz nach dem Auftreten von *C. picta* kam es im Jahr 2006 zu einem starken Ausbruch der Apfeltriebsucht (siehe Kapitel „Norditalien - Südtirol, Trient, Piemont und Aostatal“).

Die Übertragung von AP-Phytoplasma durch *C. picta* wurde durch verschiedene, unabhängige Studien in Italien und Deutschland nachgewiesen (Frisinghelli *et al.* 2000; Seemüller *et al.* 2004; Jarausch *et al.* 2004a; Carraro *et al.* 2008; Oppedisano *et al.* 2019b). Interessanterweise gelang es nur in Nordwest-Italien und Trient, Übertragungsstudien von AP-Phytoplasma mit *C. melanoneura* durchzuführen (Tedeschi *et al.* 2003; Tedeschi und Alma 2004; Mattedi *et al.* 2008d; Oppedisano *et al.* 2019b), in Deutschland jedoch nicht (Seemüller *et al.* 2004; Mayer *et al.* 2009). Diese Ergebnisse führten zu der Hypothese, dass bestimmte AP-Phytoplasma-Subtypen mit bestimmten *C. melanoneura*-Populationen in verschiedenen Regionen in Verbindung stehen könnten (Mayer *et al.* 2009). So können genetische Typisierungsdaten helfen, lokale und periodisch auftretende Ausbrüche der Apfeltriebsucht und deren Assoziation mit bestimmten Insekten zu erklären. Ein zukünftiger Ansatz sollte darin bestehen, Daten aus der Typisierung von Phytoplasmen, Phytoplasma (Stamm)-Insekt (Vektor)-Verbindungen sowie der Genetik und dem Verhalten von Insektenpopulationen

loci analizzati e quindi dipende fortemente dallo specifico problema e dalla domanda affrontata nello studio relativo. Pertanto, l'analisi di diversi loci rende spesso difficile confrontare e interpretare i dati di diversi autori e studi. In futuro è raccomandato utilizzare un metodo di tipizzazione uniforme per studiare la distribuzione spazio-temporale e la diffusione del fitoplasma AP.

## Diagnosi molecolare

Negli ultimi decenni, diversi tipi di analisi sono stati utilizzati per la diagnostica del fitoplasma. Questi test diagnostici spaziano da saggi biologici in cui il materiale infetto sospetto viene innestato su piante indicatrici legnose o analisi sierologiche che utilizzano anticorpi specifici contro il fitoplasma AP, ad es. analisi immuno-adsorbenti legati ad un enzima (ELISA), o rilevazioni con immunofluorescenza. Tuttavia, queste tecniche spesso richiedono molto impegno, hanno una bassa sensibilità o sono inclini a generare risultati falsi-negativi. Per un rilevamento affidabile e più facile del fitoplasma AP nelle piante e negli insetti, sono stati messi a punto diversi strumenti molecolari. Si basano tutti sulla rilevazione del DNA specifico di AP. L'amplificazione PCR delle regioni di DNA specifiche per AP è lo strumento diagnostico più sensibile e affidabile. La maggior parte degli autori segue le procedure sviluppate da Kirkpatrick *et al.* (1987), Ahrens e

.....

zu kombinieren. Dies erfordert fundiertes Wissen über die Parameter, die das hochkomplexe biologische System der AP-Verbreitung beeinflussen. Diese Erkenntnisse können genutzt werden, um Vorhersagemodelle zur Apfeltriebsuchtausbreitung zu entwickeln. Die Erkenntnisse aus molekularen Typisierungs- und Sequenzanalysen können weitere wichtige Erklärungsansätze darüber liefern, welche Faktoren am Zusammenspiel zwischen Virulenz und Vektorspezifität beteiligt sind. Außerdem ist die genetische Typisierung ein interessanter Ansatz für eine Art molekularer Identifizierung ursprünglicher Infektionsquellen. Jeder Typisierungsansatz ist auf die Art der analysierten Loci begrenzt und hängt daher stark vom jeweiligen Problem und der in der jeweiligen Studie behandelten Frage ab. So erschwert die Analyse verschiedener Loci oft den Vergleich und die Interpretation von Daten verschiedener Autoren und Studien. Es wäre daher empfehlenswert einheitliche Typisierungsmethoden zu verwenden, um die räumlich-zeitliche Verteilung und Ausbreitung von AP zu untersuchen.

## Molekulare Diagnose

In den letzten Jahrzehnten wurden verschiedene Methoden in der Diagnostik von Phytoplasmen eingesetzt. Diese Methoden umfassen eine Bandbreite verschiedenster Techniken; von biologischen Assays, bei denen potentiell infiziertes Material auf Indikatorpflanzen

Seemüller (1992) e Maixner *et al.* (1995) per l'estrazione del DNA e l'arricchimento del DNA del fitoplasma usando il tessuto del floema dei meli. Il metodo di Doyle e Doyle (1990) è ampiamente utilizzato per l'estrazione del DNA da piante e insetti (Firrao *et al.* 1994; Tedeschi *et al.* 2002; Carraro *et al.* 2008).

La nested PCR, una metodologia di amplificazione del DNA altamente sensibile che comprende due cicli separati di PCR, è stata impiegata per il rilevamento del fitoplasma AP nelle piante e negli psillidi utilizzando primer universali (P1/P7 + F2n/R2) e primer specifici del gruppo 16SrX (P1/P7 + fO1/rO1) (Lee *et al.* 1995; Lorenz *et al.* 1995). La nested PCR è consigliabile se si sospetta una bassa concentrazione o una distribuzione non uniforme del patogeno nell'ospite. A causa della similarità genetica all'interno del gruppo di fitoplasm AP, l'identificazione specifica spesso richiede ulteriori passi, come la digestione degli ampliconi con diversi enzimi di restrizione e la successiva analisi RFLP o sequenziamento (Kison *et al.* 1994; Lee *et al.* 1995; Lorenz *et al.* 1995; Razin e Tully 1995; Gundersen e Lee 1996; Smart *et al.* 1996; Jarausch *et al.* 2000). Un protocollo di immunocattura PCR (IC-PCR) è stato proposto da Heinrich *et al.* (2001) per un rilevamento sensibile, affidabile e riproducibile su larga scala del fitoplasma AP. I protocolli per la differenziazione dei ceppi AP sono stati pubblicati da Jarausch *et al.* (2000), Casati *et al.* (2010) e Baric *et al.* (2011a). Diversi protocolli quantitativi di PCR real-time

---

gepfropft wird, bis hin zu serologischen Assays mit AP-spezifischen Antikörpern, z. B. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) oder Immunfluoreszenz-Nachweis. Diese Techniken sind jedoch oft arbeitsintensiv, haben eine geringe Sensitivität und sind deshalb anfällig für falsch-negative Ergebnisse. Für einen zuverlässigen und weniger umständlichen Nachweis von AP-Phytoplasma bei Pflanzen und Insekten wurden verschiedene molekulare Methoden entwickelt, die auf dem Nachweis AP-spezifischer DNA mittels PCR basieren. Die meisten Autoren nutzen die von Kirkpatrick *et al.* (1987), Ahrens und Seemüller (1992) und Maixner *et al.* (1995) entwickelten Verfahrensweisen zur DNA-Extraktion und Phytoplasmen-DNA Aufreinigung aus Phloemgewebe von Apfelbäumen. Die Methode von Doyle und Doyle (1990) ist ebenfalls weit verbreitet für DNA-Extraktion aus Pflanzen und Insekten (Firrao *et al.* 1994; Tedeschi *et al.* 2002; Carraro *et al.* 2008).

Die sogenannte "nested" PCR ist eine hochsensitive DNA-Amplifikation, die in zwei getrennten PCR-Läufen durchgeführt wird. Sie wird für den Nachweis von AP-Phytoplasma in Pflanzen und Psylliden unter Verwendung von Universalprimern (P1/P7 + F2n/R2) und 16SrX-gruppenspezifischen Primern (P1/P7 + fO1/rO1) eingesetzt (Lee *et al.* 1995; Lorenz *et al.* 1995). Die nested PCR empfiehlt sich dann, wenn eine geringe Konzentration oder eine ungleichmäßige Verteilung des Erregers im Wirt vermutet wird. Aufgrund der genetischen Ähnlichkeit der Phytoplasmen innerhalb der 16SrX -Gruppe sind für die spezifische

sono stati sviluppati per AP in piante e insetti, basati su tecnologie SYBR Green (Jarusch *et al.* 2004b; Galetto *et al.* 2005; Torres *et al.* 2005), TaqMan™ (Baric e Dalla Via 2004; Aldaghi *et al.* 2007; 2008) e EvaGreen® (Monti *et al.* 2013). I metodi PCR descritti richiedono attrezzature di laboratorio specifiche e devono essere eseguiti da personale esperto. Negli ultimi anni, la LAMP (loop-mediated isothermal amplification) è diventata un metodo diagnostico in sito interessante, veloce, economico e sensibile per il rilevamento del fitoplasma (Notomi 2000; Dickinson 2015). Diversi lavori presentano risultati promettenti che evidenziano come la LAMP potrebbe essere in futuro un metodo diagnostico affidabile per l'AP (Neumüller *et al.* 2014; De Jonghe *et al.* 2017).

---

Identifizierung oft weitere Schritte notwendig, wie z. B. Sequenzierung oder der Amplikonverdau mit bestimmten Restriktionsenzymen und anschließender RFLP-Analyse (Kison *et al.* 1994; Lee *et al.* 1995; Lorenz *et al.* 1995; Razin und Tully 1995; Gundersen und Lee 1996; Smart *et al.* 1996; Jarusch *et al.* 2000). Eine "immunocapture"-PCR (IC-PCR) für einen empfindlichen, zuverlässigen und reproduzierbaren Hochdurchsatznachweis von Apfeltriebsucht-Phytoplasmen wurde von Heinrich *et al.* (2001) vorgeschlagen. Protokolle zur Differenzierung von AP-Stämmen wurden von Jarusch *et al.* (2000), Casati *et al.* (2010) und Baric *et al.* (2011a) veröffentlicht. Zum Nachweis von AP wurden unterschiedliche quantitative „realtime“-PCR Protokolle auf der Basis von SYBR Green (Jarusch *et al.* 2004b; Galetto *et al.* 2005; Torres *et al.* 2005), TaqMan™ (Baric und Dalla Via 2004; Aldaghi *et al.* 2007; 2008) und EvaGreen® Technologien entwickelt (Monti *et al.* 2013). Die beschriebenen PCR-Methoden erfordern allerdings eine spezielle Laborausstattung und müssen von erfahrenem Personal durchgeführt werden. Die „loop-mediated isothermal amplification“ (LAMP) hat sich in den letzten Jahren zu einem interessanten, schnellen, kostengünstigen und empfindlichen Vor-Ort-Diagnoseverfahren zum Nachweis von Phytoplasmen entwickelt (Notomi 2000; Dickinson 2015). Mehrere Berichte zeigen vielversprechende Ergebnisse, so dass die LAMP in Zukunft eine zuverlässige Diagnosemethode für AP darstellen könnte (Neumüller *et al.* 2014; De Jonghe *et al.* 2017).