



**Settimana
della
Biodiversità
Pugliese**
Agricoltura
Alimentazione
e Ambiente

**20-26
MAGGIO
2023**



REGIONE PUGLIA
ASSESSORATO AGRICOLTURA



**MINISTERO DELL'AGRICOLTURA
DELLA SOVRANITÀ ALIMENTARE
E DELLE FORESTE**



**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI DI BARI
ALDO MORO**
DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL SUOLO
DELLA PIANTA E DEGLI ALIMENTI - DISSAFA

settimanabiodiversitapugliese.it



Settimana
della
Biodiversità
Pugliese

Agricoltura
Alimentazione
e Ambiente

20-26
MAGGIO
2023

INNESTO PER GESTIRE
TOMATO LEAF CURL
NEW DELHI VIRUS
(ToLCNDV) SU
CUCURBITACEE

Dott.ssa Mariarosaria Mastrochirico

Dott.ssa Spanò Roberta

Prof.ssa Tiziana Mascia



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI DI BARI
ALDO MORO

DISSPA – DIPARTIMENTO DI
SCIENZE DEL SUOLO, DELLA
PIANTA E DEGLI ALIMENTI

Tomato leaf curl New Delhi virus (ToLCNDV)

FAMIGLIA: *Geminiviridae*, GENERE: *Begomovirus*

- E' un virus emergente nell'area mediterranea.
- Nel 2017 è stato inserito come patogeno da quarantena nella **Alert-list 2** della **EPPO**.
- ToLCNDV è particolarmente dannoso su cucurbitacee coltivate in pieno campo e in ambiente protetto, dove può causare perdite di produzione prossime al 100%.
- E' trasmesso da *Bemisia tabaci*, una mosca bianca molto diffusa nel nostro territorio.
- In Puglia è stato isolato nel 2018 in campi commerciali di zucchini.
- **SINTOMI**: Ingiallimento e necrosi delle foglie, arricciamento fogliare, rugosità dei frutti e accrescimento stentato (Figura 1).

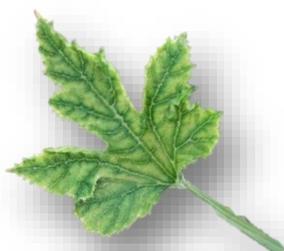


Figura 1. Sintomi indotti da *Tomato leaf curl New Delhi* (ToLCNDV) su piante di cucurbitacee.



ToLCNDV è stato segnalato per la prima volta in India nel 1995 su colture di pomodoro e cucurbitacee, si è poi diffuso in diversi paesi asiatici e nell'area mediterranea compresa l'Italia dove è stato rilevato per la prima volta nel 2015 in Sicilia, in colture a campo aperto di zucchini. In Puglia, il virus è stato isolato nel 2018 in campi commerciali di zucchini e melone, e nel 2020 in colture protette di zucchini con gravi infestazioni di mosca bianca (Figura 2).



Figura 2. Distribuzione geografica della presenza di *Tomato leaf curl New Delhi virus* (ToLCNDV) in piante ospiti.

Tomato leaf curl New Delhi virus è un begomovirus floematico bipartito con un'organizzazione genomica costituita da due componenti circolari di DNA a singolo filamento (DNA-A e DNA-B) rispettivamente di circa 2,7 Kb e 2,6 Kb. Il DNA-A si compone di sette Open reading frames (ORF: AV1, AV2, AC1, AC2, AC3, AC4 e AC5) che codificano proteine coinvolte nella replicazione del virus, nella trascrizione del gene virale, nella patogenesi e nell'incapsidamento. Il DNA-B ha due ORF (BC1 e BV1) che codificano due proteine coinvolte nel movimento del virus e prodotti genici (Figura 3).

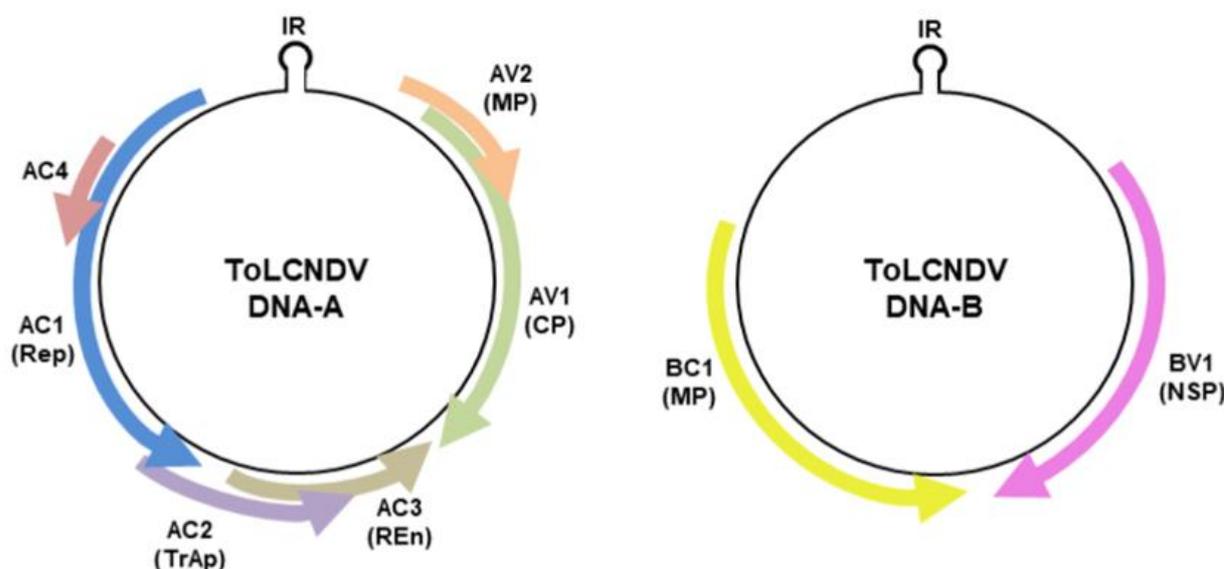


Figura 3. Organizzazione del genoma di *Tomato leaf curl New Delhi virus* (ToLCNDV). Componenti genomiche DNA-A e DNA-B con frecce che mostrano i rispettivi geni (Zaidi et al., 2017).



ToLCNDV – isolato pugliese

In **Italia**, ToLCNDV è stato ritrovato in coltivazioni di zucchini, nello specifico nel 2015 è stato segnalato il suo primo ritrovamento in Sicilia, nel 2016 in Campania, Lazio e Sardegna e nel 2017 in Calabria. Il primo ritrovamento di ToLCNDV in Puglia risale al 2018 in campi commerciali di zucchini sulla costa ionica a confine tra Puglia e Basilicata (*Trisciuzzi et al.*, 2018).

La diffusione rapida del virus nell'areale mediterraneo e la presenza sempre più frequente del vettore impone l'adozione urgente di misure di contenimento.

Un approccio sostenibile ricade nell'impianto di cultivar resistenti.

Ad oggi sono state individuate resistenze genetiche in *Cucurbita moschata* e *Luffa cylindrica* ma al momento non sono disponibili varietà commerciali resistenti (*Saez et al.* 2016; *Saez et al.* 2020).

Per questa ragione l'innesto potrebbe fornire una soluzione più rapida e flessibile al fine di **trasmettere livelli utili di tolleranza al virus** in varietà suscettibili e di interesse commerciale.



OBIETTIVO DEL PROGETTO

Analizzare mediante screening varietale i livelli di suscettibilità e tolleranza all'isolato pugliese di ToLCNDV in varietà locali e commerciali di cucurbitacee avvalendosi della **BIODIVERSITÀ**.

Il recupero dei semi delle varietà di cucurbitacee è stato permesso grazie al contributo del Vivaio f.lli Corrado (Torre Santa Susanna, BR), del Prof. Ricciardi Luigi (DiSSPA), nonché responsabile scientifico del germoplasma conservato nell'azienda Martucci di (Valenzano BA e al Vivaio Junior Plant di Mizzi Cosimo, (Fasano, BR).

Le piante di cucurbitacee sono state inoculate meccanicamente con un isolato pugliese di ToLCNDV denominato **ToLCNDV-Le**, per valutare lo sviluppo dei sintomi della malattia e l'accumulo di DNA virale fino a 28 giorni dopo l'inoculazione (dpi). Sulla base dei sintomi della malattia sviluppati, le piante sono state classificate come tolleranti, moderatamente tolleranti, moderatamente suscettibili e suscettibili (Tabella 1, Figura 4).



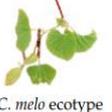
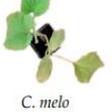
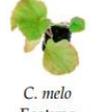
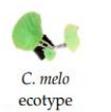
ToLCNDV-Le Infection CATEGORY	SYMPTOMS	PHENOTYPE					
TOLERANT	No visible symptoms and normal growth	 <i>C. maxima</i> cv. Invernale rigata	 <i>C. pepo</i> accession 5	 <i>C. melo</i> cv. Tendral verde	 <i>C. melo</i> cv. Barattiere	 <i>C. melo</i> ecotype Invernale variopinto	
MODERATELY TOLERANT	Slight yellowing on leaves and normal growth	 <i>C. melo</i> ecotype Verde tondo	 <i>C. melo</i> Ecotype Invernale giallo	 <i>C. melo</i> ecotype Invernale a fasce	 <i>C. melo</i> Ecotype Invernale bianco	 <i>C. melo</i> cv. Rugoso di Cosenza	 <i>C. melo</i> cv. Retato standard
MODERATELY SUSCEPTIBLE	Yellowing and slight mosaic on leaves, normal plant growth	 <i>C. pepo</i> cv. President	 <i>C. melo</i> ecotype Retato (Cantalupo)	 <i>C. pepo</i> accession 63	 <i>C. moschata</i> cv. Moscata di Provenza	 <i>C. moschata</i> cv. Cucuzza Genovese	
SUSCEPTIBLE	Curling, yellowing and mosaic on leaves, stunted growth	 <i>C. pepo</i> cv. Howden	 <i>C. pepo</i> cv. Scuro di Milano	 <i>L. siceraria</i> spp.	 <i>C. melo</i> cv. Retato standard (F1 hybrid)	 <i>C. pepo</i> cv. Corritore	

Tabella 1. Valutazione visiva dei sintomi indotti da ToLCNDV-Le in Cucurbita, Cucumis e Lagenaria spp. a 28 giorni dopo l'inoculazione (dpi) e classificate come tollerante, moderatamente tollerante, moderatamente suscettibile e suscettibile sulla base dei sintomi della malattia sviluppati (Mastrochirico et al., 2023).

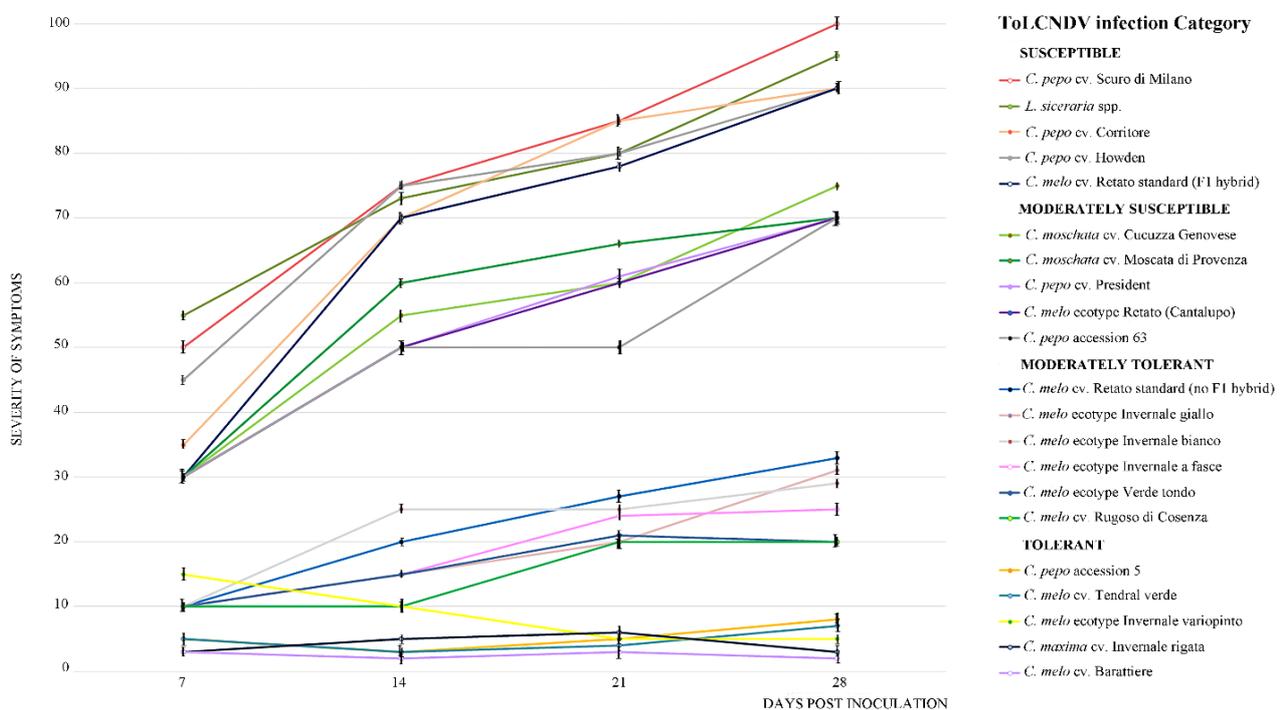


Figura 4. Gravità dei sintomi indotti da ToLCNDV-Le (da 0, assente, a 100, gravità massima, distribuita in quattro parti uguali) osservata a 7,14,21, e 28 giorni dopo l'inoculazione (dpi) nei genotipi di 21 cucurbitacee. Ogni punto sul grafico a linee rappresenta la media di dieci piante dello stesso genotipo che mostrano la stessa gravità dei sintomi con relative barre di errore (Mastrochirico et al., 2023).



La gravità dei sintomi è stata correlata con il titolo virale mediante analisi quantitativa dot-blot a 14 e 28 dpi nei tessuti fogliari infetti sistemicamente (Figura 5).

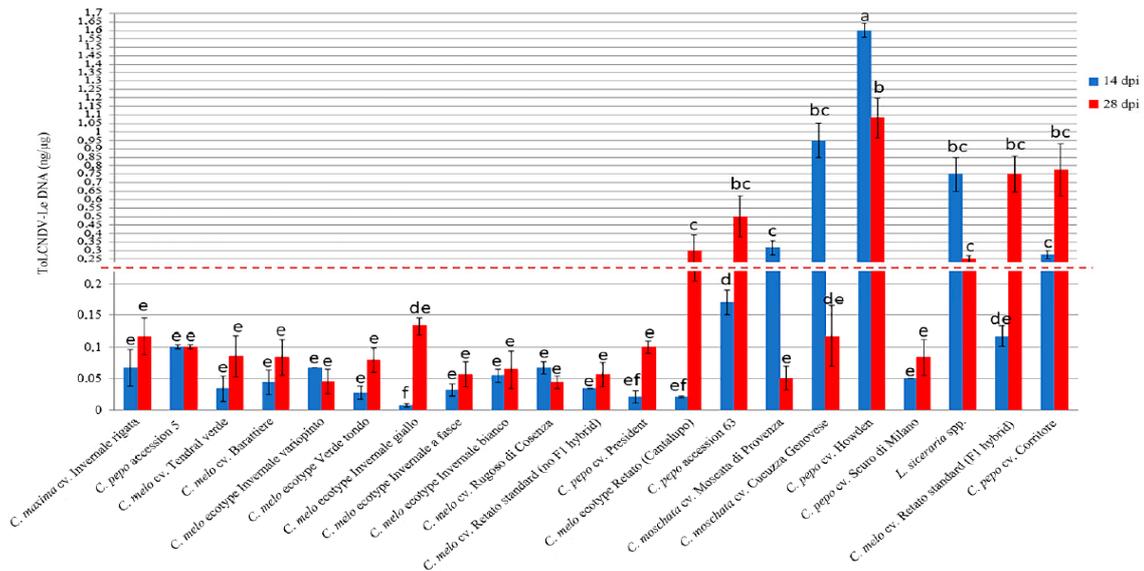
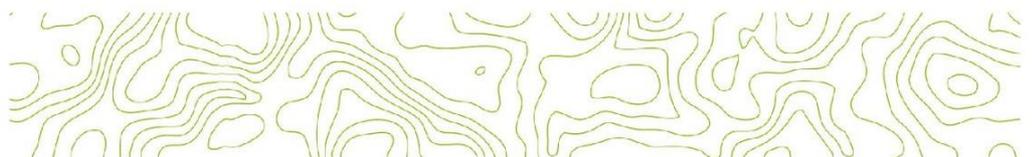


Figura 5. Quantificazione del titolo virale mediante dot-blot nelle diverse *Cucurbita* spp. selezionate a 14 (blu) e 28 (rosso) giorni dopo l'inoculazione (dpi). L'accumulo di DNA del virus è stato valutato in due repliche biologiche di dieci piante ciascuna e due repliche tecniche mediante ibridazione dot-blot utilizzando una sonda di DNA marcata con digossigenina specifica per la Coat protein (CP) di ToLCNDV. Il segnale chemiluminescente è stato quantificato dal software Quantity One (BioRad Laboratories). Lettere diverse rappresentano differenze statisticamente significative delle medie secondo l'analisi fattoriale della varianza (ANOVA) ($p \leq 0,05$) (test di Tukey). Le barre verticali sulle colonne rappresentano le deviazioni standard tra i replicati (Mastrochirico et al., 2023).

Tra le varietà più tolleranti all'infezione virale, *Cucumis melo* cv. **Barattiere** non ha mostrato sintomi di malattia significativi e sono stati registrati livelli molto bassi di accumulo di DNA virale; per questo motivo e per le sue caratteristiche morfologiche che ben si prestano per la tecnica dell'innesto, (Figura 6) è stato selezionato per essere utilizzato come **portainnesto** al fine di trasmettere livelli utili di tolleranza alle varietà suscettibili e di interesse commerciale come: *C. moschata* cvs. Cucuzza Genovese and Moscata di Provenza, *C. melo* cv. Retato standard (F1 hybrid) and ecotype Retato (Cantalupo), *C. pepo* cvs. Corriatore, President, Howden, Scuro di Milano, and accession 63, and *L. siceraria* spp.



Figura 6. Realizzazione dell'innesto in piante di *Cucumis melo* cv. Barattiere.



In una fase iniziale della crescita, l'inoculazione di ToLCNDV-Le non ha influenzato la morfologia complessiva della pianta, infatti questi parametri erano molto simili a quelli delle piante non innestate ma, in una fase successiva, le piante innestate sono apparse meno vigorose di quelle non innestate. Complessivamente, i sintomi di malattia sul nesto erano meno gravi e in tutti gli innesti è stato osservato un ritardo generalizzato nella comparsa dei sintomi suggerendo che l'approccio dell'innesto potrebbe migliorare la tolleranza delle cucurbitacee all'infezione di ToLCNDV-Le (Figura 7).



Figura 7. Fenotipo della malattia indotto da ToLCNDV-Le sulle diverse combinazioni di innesto con genotipi di cucurbitacee sensibili e moderatamente sensibili innestati sull'ecotipo locale tollerante *C. melo* cv. Barattiere usato come portainnesto comune. Foto scattate a 14 giorni dopo l'inoculazione (dpi) con ToLCNDV-Le: *C. pepo* cv. Presidente (A); *C. moscata* cv. Moscata di Provenza (B); *C. pepo* cv. Howden (C); *C. pepo* cv. Scuro di Milano (D); *C. pepo* cv. Corridoio (E); *C. melo* ecotipo Retato (Cantalupo) (F); *C. moschata* cv. Cucuzza Genovese (G); *L. siceraria* spp. (H); *C. melo* cv. Retato standard (ibrido F1) (I); *C. pepo* accessione 6 (K) (Mastrochirico et al., 2023).

Inoltre, la gravità dei sintomi della malattia nelle piante innestate era congruente con l'accumulo del DNA virale stimato a 14 e 28 dpi (Figura 8).



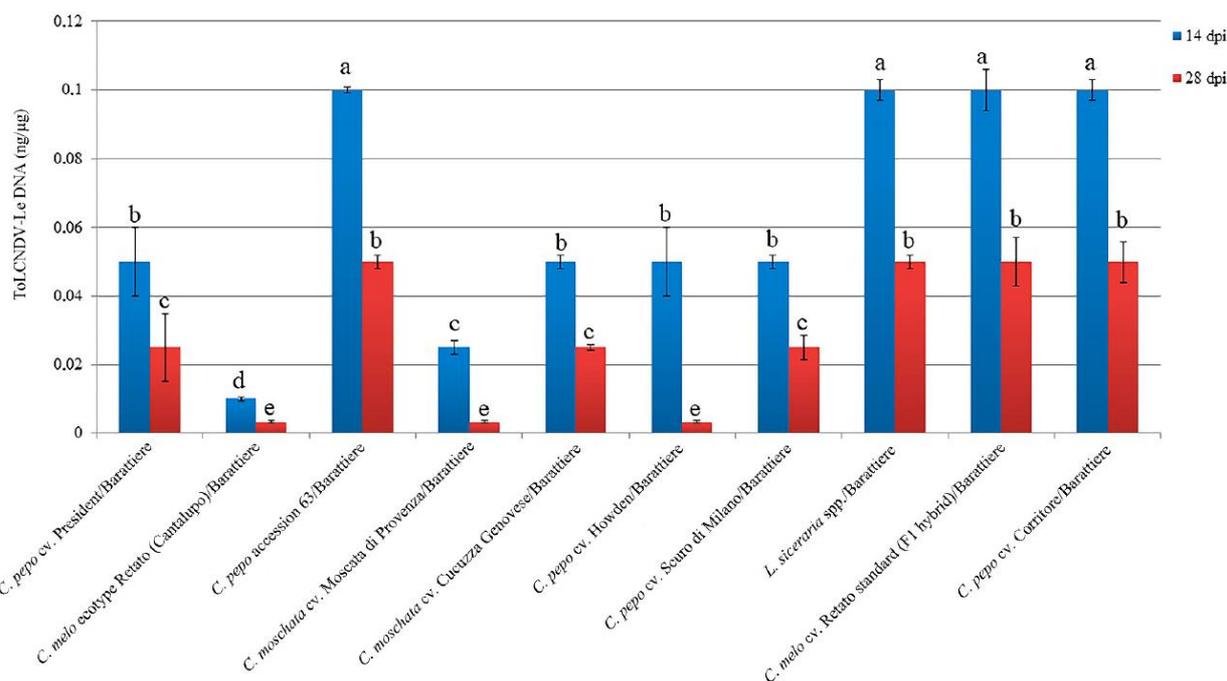


Figura 8. Accumulo di DNA virale in foglie con infezione sistemica di diversi genotipi infettati con ToLCNDV-Le innestati su *C. melo* cv. Barattiere usato come portainnesto. L'accumulo di DNA virale è stato stimato mediante analisi quantitativa di ibridazione dot-blot utilizzando una sonda di DNA marcata con digossigenina specifica per il virus. La quantificazione del DNA virale a 14 (blu) e 28 (rosso) giorni dopo l'inoculazione (dpi). è stata valutata con il software Image Lab (BioRad Laboratories). Sono state utilizzate cinque diluizioni (1:2) di un controllo positivo standard. Lettere diverse rappresentano differenze statisticamente significative delle medie secondo l'analisi fattoriale della varianza (ANOVA) ($p \leq 0,05$) (test di Tukey). Le barre verticali sulle colonne rappresentano le deviazioni standard tra i replicati (Mastrochirico et al., 2023).

Tali risultati suggeriscono che l'approccio dell'innesto potrebbe migliorare la tolleranza delle cucurbitacee all'infezione di ToLCNDV-Le. Di fatto, tale studio è anche in linea con il Piano italiano di ripresa e resilienza (**RRP, Italy's recovery and resilience plan**), e con gli obiettivi ambientali europei e nazionali nel campo della sostenibilità e biodiversità in agricoltura.

Fonte: Mastrochirico M., Spanò R., Mascia T. 2023. Grafting to Manage Infections of the Emerging Tomato Leaf Curl New Delhi Virus in Cucurbits. Plants, 12, 37. <https://doi.org/10.3390/plants12010037>.

