

Molecular genotyping of '*Candidatus Phytoplasma solani*' strains identified in medicinal and aromatic plants in Lombardy (northern Italy)

C. Barbieri¹, P. Casati¹, P.A. Bianco¹, F. Quaglino¹

¹Department of Agricultural and Environmental Sciences, University of Milan, Milan, Italy

The present study aimed to identify and characterize phytoplasmas detected in medicinal and aromatic plants cultivated in two farms in Lombardy (North Italy), one managed organically and the other biodynamically. The research involved the following experimental phases: (i) observation of symptoms associated with phytoplasma infection and collection of leaf samples from 113 plants (both symptomatic and asymptomatic) belonging to 18 species; (ii) extraction of total nucleic acids; (iii) molecular identification of phytoplasmas through amplification of the 16S rRNA gene followed by restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis and nucleotide sequencing; (iv) molecular characterization of the identified phytoplasmas through analysis of the nucleotide sequences of the hypervariable *stamp* and *vmp1* genes. Molecular analyses revealed the presence of '*Candidatus Phytoplasma solani*' (16SrXII-A) in 69 plants (61% infection rate) belonging to 14 of the 18 examined species. Among the 14 infected species, only *Nepeta cataria* L. exhibited symptoms typically associated with phytoplasma infection (leaf and stem reddening). The results of the molecular characterization showed that all '*Ca. P. solani*' strains identified in this study were indistinguishable based on the sequence identity of the *stamp* gene (St5 variant, widely reported in Northern Italy in numerous host plants and insect vectors) and *vmp1* gene (V24 profile; new sequence variant Vm93: 95% nucleotide sequence identity with Vm44 and Vm45 variants). Subsequent phylogenetic analyses indicated that the St5/Vm93 genotype of '*Ca. P. solani*' belongs to cluster b-II, which contains phytoplasma genotypes primarily associated with bindweed. Moreover, it is noteworthy that the alignment of the *in silico* translated Vmp1 protein sequences suggests possible recombination events, previously reported in the literature for other phytoplasmas, between co-infecting '*Ca. P. solani*' strains in bindweed. In this study, 13 out of 14 medicinal and aromatic species (except *N. cataria*), although infected by '*Ca. P. solani*', were asymptomatic. Given the results obtained and the literature reporting variations in the composition of biologically active compounds in phytoplasma-infected plants (both symptomatic and asymptomatic), it is of great interest to study the variations in secondary metabolites contained in these compounds extracted from the medicinal and aromatic species examined in this study.

Caratterizzazione molecolare di ceppi di '*Candidatus Phytoplasma solani*' in piante officinali in Lombardia

C. Barbieri¹, P. Casati¹, P.A. Bianco¹, F. Quaglino¹

¹Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali, Università di Milano, Milano, Italia

Il presente studio si è posto l'obiettivo di identificare e caratterizzare i fitoplasmi presenti in piante officinali coltivate in due aziende lombarde, rispettivamente a gestione biologica e biodinamica. Il lavoro ha previsto le seguenti fasi sperimentali: (i) osservazione di sintomi associabili alla presenza di fitoplasmi e raccolta di campioni fogliari da 113 piante (sintomatiche e asintomatiche) appartenenti a 18 specie; (ii) estrazione degli acidi nucleici totali; (iii) identificazione molecolare dei fitoplasmi mediante amplificazione del gene 16S rRNA seguita da restrizione enzimatica (RFLP, "restriction fragment length polymorphism") e analisi delle sequenze nucleotidiche; (iv) caratterizzazione molecolare dei fitoplasmi identificati attraverso analisi delle sequenze nucleotidiche dei geni iper-variabili *stamp* e *vmp1*. Le analisi molecolari hanno permesso di rilevare la presenza di '*Candidatus Phytoplasma solani*' (16SrXII-A) in 69 piante (percentuale di infezione del 61%) appartenenti a 14 delle 18 specie esaminate. Tra le 14 specie risultate infette, soltanto *Nepeta cataria* L. presentava sintomi tipicamente associabili ad infezione da fitoplasmi (arrossamenti di foglia e fusto). I risultati della caratterizzazione molecolare hanno evidenziato che tutti i ceppi di '*Ca. P. solani*', identificati in questo lavoro, sono risultati indistinguibili sulla base dell'identità di sequenza dei geni *stamp* (variante St5, già ampiamente riportata in Italia settentrionale in numerose piante ospiti e insetti vettori) e *vmp1* (profilo V24; nuova variante di sequenza Vm93: identità di sequenza nucleotidica del 95% con le varianti Vm44 e Vm45). Successive analisi filogenetiche hanno evidenziato che il genotipo di '*Ca. P. solani*' St5/Vm93 appartiene al cluster b-II, che contiene genotipi del fitoplasma principalmente individuati in convolvolo. Inoltre, è interessante notare che l'allineamento delle sequenze proteiche Vmp1 (tradotte *in silico*) suggerisce possibili eventi di ricombinazione, già riportati in letteratura per altri fitoplasmi, tra ceppi di '*Ca. P. solani*' co-infettanti convolvolo. In questo lavoro, 13 specie officinali su 14 (con l'eccezione di *N. cataria*), seppur infette da '*Ca. P. solani*', sono risultate asintomatiche. Alla luce dei risultati ottenuti e della letteratura che riporta variazioni nella composizione dei composti biologicamente attivi in piante (sintomatiche e asintomatiche) infette da fitoplasmi, risulta di grande interesse lo studio delle variazioni dei metaboliti secondari contenuti in tali composti estratti dalle specie officinali esaminate in questo studio risultate positive alla presenza di '*Ca. P. solani*'.