

Exploring the genomic variability and the molecular mechanisms underlying pathogenesis of '*Candidatus Phytoplasma solani*'

A. Moussa¹, W. Acosta², C. Barbieri¹, C. Bernardini², P. Ermacora², G. Firrao², F. Pavan², M. Martini², F. Quaglino¹

¹Department of Agricultural and Environmental Sciences, University of Milan, Milan, Italy; ²Department of Agricultural, Food, Environmental and Animal Sciences (DI4A), University of Study of Udine, Udine, Italy

'*Candidatus Phytoplasma solani*' is associated with diseases of several economic crops including grapevine and tomato, leading to considerable economic losses in Europe and the Mediterranean region. The '*Ca. P. solani*' ecology is extremely complex, including multiple insect vectors, primarily the planthopper *Hyalesthes obsoletus*, and plant hosts species in agroecosystems. Understanding the intricate web of interactions between this phytoplasma and its hosts is crucial for developing effective management strategies. Phytoplasma pathogenicity is mediated by a suite of effector proteins that manipulate host plant physiology to facilitate colonization and spread through interference in hormone signaling pathways, cell cycle regulation, and immune responses, leading to symptom appearance. This study aimed to identify '*Ca. P. solani*' putative effectors from a total of nine genomes of different strains belonging to *tuf-a* and *tuf-b1* types and evaluate their expression variations between tomato, periwinkle, and grapevine. The core analysis of genome information was done by identifying the protein-coding sequence (CDS) region of each gene using PRODIGAL on the command line. Prediction of putative effectors was carried out using SignalP.03, and TargetP.02 which incorporates a prediction of cleavage sites, and a signal peptide/non-signal peptide prediction based on a combination of several artificial neural networks and hidden Markov models. Putative effectors with signal peptides went through functional analysis of proteins by classifying them into families and predicting domains and important sites using InterProScan. The bioinformatic analysis resulted in the identification of a total of 30 putative effectors of which 12 localized within sequence variable mosaic (SVM) regions and 18 outside SVM regions. Interestingly, seven SVM and eight no-SVM effectors were identified exclusively in *tuf-b1* type strains, four SVM and three no-SVM exclusively in *tuf-a* type strain, and one SVM and seven no-SVM effectors were shared by *tuf-a* and *tuf-b1* type strains. Quantitative PCR primer pairs were designed on nucleotide sequences of the identified effector genes using the PRIMER3 software and underwent PCR for evaluating their specificity. Specific primer pairs will be employed to evaluate putative effector gene expression in tomato, periwinkle, and grapevine for investigating associations between type of symptoms, symptom severity, and '*Ca. P. solani*' type-specific effector(s). The absolute quantity of phytoplasma transcripts of a sample will be normalized with the phytoplasma population measured for the same sample by qPCR, obtaining a value referred to as Expression Index (EI, transcript copy number per phytoplasma cell). The results of this work would increase the knowledge of molecular mechanisms involved in '*Ca. P. solani*'-host interactions, opening new perspectives for sustainable control measures.

Variabilità genomica e meccanismi molecolari alla base della patogenesi di '*Candidatus Phytoplasma solani*'

A. Moussa¹, W. Acosta², C. Barbieri¹, C. Bernardini², P. Ermacora², G. Firrao², F. Pavan², M. Martini², F. Quaglino¹

¹Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali, Università di Milano, Milano, Italia; ²Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari, Ambientali e Animali, (Di4A), Università degli Studi di Udine, Udine, Italia.

'*Candidatus Phytoplasma solani*' è associato a malattie di numerose specie di piante coltivate, tra cui vite e pomodoro, che causano notevoli perdite economiche in Europa e nell'areale del bacino del Mediterraneo. L'epidemiologia di '*Ca. P. solani*' è complessa e coinvolge numerosi insetti vettori (principalmente la cicalina *Hyalesthes obsoletus*) e piante ospiti presenti negli agroecosistemi. Per sviluppare metodi di gestione più mirati ed efficaci, è necessario comprendere l'intricata rete di interazioni tra fitoplasma, insetti vettori e piante ospiti. A livello molecolare, la patogenicità dei fitoplasmii è mediata da una serie di effettori proteici che manipolano la fisiologia della pianta ospite. L'attività di questi effettori interferisce con la biosintesi degli ormoni, la regolazione del ciclo cellulare e la risposta immunitaria della pianta ospite, determinando l'insorgenza dei sintomi caratteristici e facilitando la diffusione del patogeno. Questo studio ha l'obiettivo di identificare geni codificanti gli effettori putativi in genomi di nove ceppi di '*Ca. P. solani*', appartenenti ai tipi *tuf-a* e *tuf-b1*, e di valutare la variazione della loro espressione in pomodoro, vinca e vite. L'analisi bioinformatica ha previsto: (i) identificazione di tutte le regioni codificanti dei genomi utilizzando PRODIGAL; (ii) previsione degli effettori putativi tramite SignalP.03 e TargetP.02 che identificano la presenza di siti di taglio e di peptidi segnale tramite l'impiego di una combinazione di reti neurali artificiali e di modelli Markov nascosti; (iii) analisi funzionale degli effettori putativi identificati utilizzando InterProScan (previsione domini funzionali). L'analisi bioinformatica ha portato all'identificazione di un totale di 30 effettori putativi, di cui 12 localizzati all'interno delle regioni SVM (sequenze a mosaico variabile) (effettori-SVM) e 18 al di fuori delle regioni SVM (effettori-non SVM). Interessante è il fatto che sette effettori SVM e otto non SVM siano stati identificati esclusivamente in ceppi di '*Ca. P. solani*' tipo *tuf-b1*, quattro effettori SVM e tre non SVM esclusivamente in ceppi tipo *tuf-a*, e un effettore SVM e sette nonSVM siano condivisi tra i ceppi di tipo *tuf-a* e *tuf-b1*. Utilizzando il software PRIMER3, sono state disegnate coppie di primer (per PCR quantitativa) sulle sequenze nucleotidiche dei geni effettori identificati. Queste coppie di primer specifiche verranno impiegate in pomodoro, pervinca e vite per valutare l'espressione dei geni codificanti effettori putativi, al fine di indagare l'associazione tra uno specifico effettore e tipo di sintomi e loro gravità. La quantità assoluta di trascritti fitoplasmatici di un campione sarà normalizzata rispetto alla popolazione di fitoplasma misurata per lo stesso campione tramite qPCR, ottenendo un valore denominato Indice di Espressione (IE, numero di copie di trascritti per cellula di fitoplasma). I risultati di questo lavoro aumenteranno la conoscenza dei meccanismi molecolari coinvolti nelle interazioni '*Ca. P. solani*'-ospite, aprendo nuove prospettive per misure di controllo sostenibili.