

Metodi avanzati di diagnosi fitobatteriológica

Massimo Zaccardelli* - Marco Scortichini** - Francesco Campanile*
Loredana Sigillo*** - Stefania Loreti****

*CRA-Centro di Ricerca per l'Orticoltura, Azienda Agraria e laboratori di Battipaglia (SA)

**CRA-Centro di Ricerca per la Frutticoltura, Roma

***Ente Nazionale Sementi Elette, Sezione di Battipaglia, Battipaglia (SA)

****CRA-Centro di Ricerca per la Patologia Vegetale, Roma

Cenni sui metodi tradizionali di diagnosi in fitobatteriológica

Se intendiamo la diagnosi come l'utilizzo di tecniche specifiche, rapide ed affidabili, che permettono di accertare la presenza/assenza di un batterio patogeno in tessuti vegetali senza passare per l'isolamento su substrati di crescita artificiali, prima dell'avvento della biologia molecolare, i batteri fitopatogeni venivano solitamente diagnosticati mediante alcune tecniche sierologiche quali l'ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) e l'IFA (Immunofluorescence assay).

Entrambe le tecniche prevedono l'utilizzo di un antisiero, ottenuto con ceppi (antigeni) rappresentativi della variabilità genético-fenotípica della specie o pathovar, che reagisce su supporto plastico (saggio ELISA) o di vetro (saggio IFA) con tessuti della pianta opportunamente processati per liberare eventuali cellule del batterio. Su

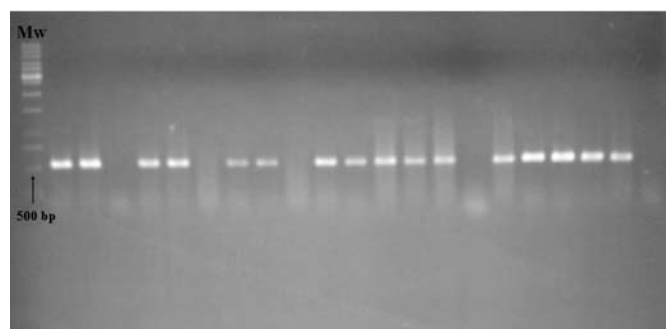


Figura 1 - Visualizzazione, in gel di agarosio, dell'amplicone del gene $hrpZ_{Pst}$ di *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, ottenuto utilizzando i primer MM5 e MM6 (da Zaccardelli *et al.*, 2005).

Figure 1 - Visualization, in agarose gel, of $hrpZ_{Pst}$ gene of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, obtained using MM5 and MM6 primers (by Zaccardelli *et al.*, 2005).

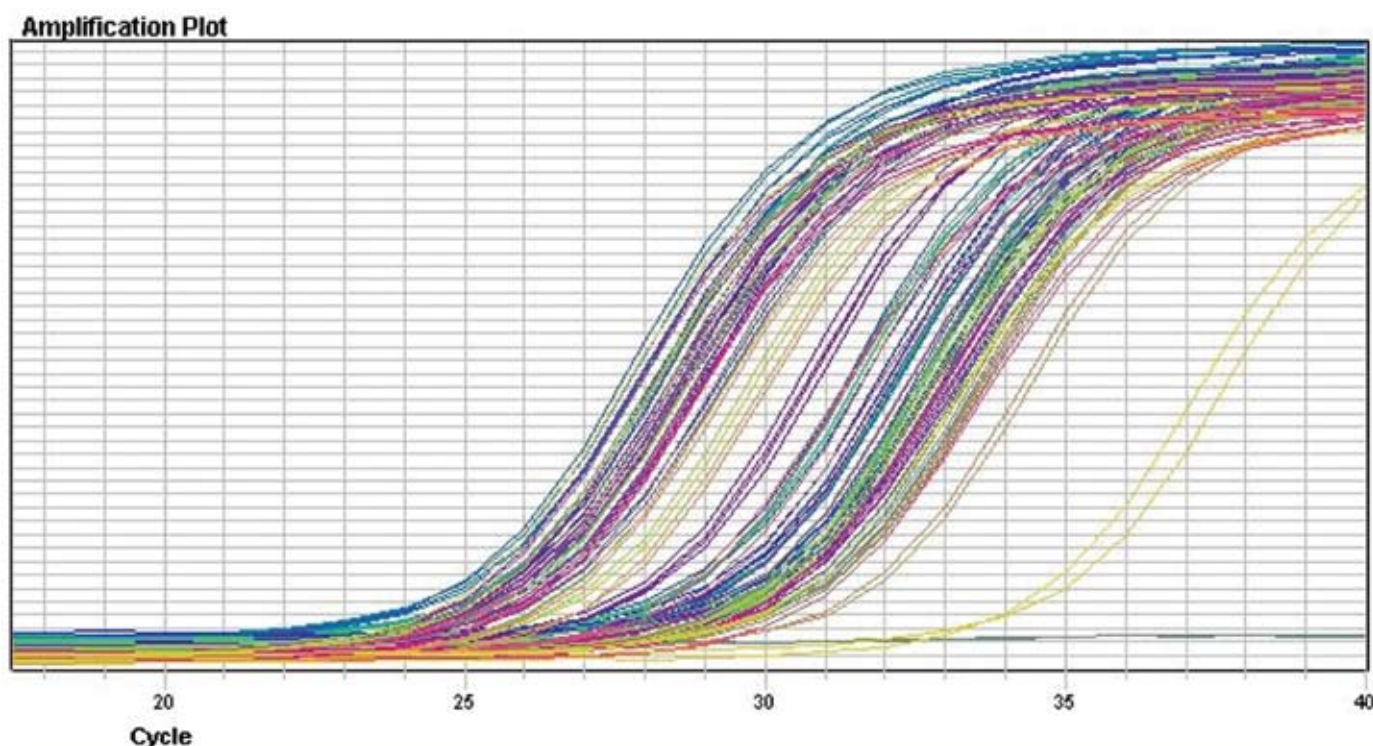


Figura 2 - Andamento dell'amplificazione in *real time*-PCR.

Figure 2 - Trend of amplification in *real time*-PCR.

Tabella 1 - Protocolli di PCR disponibili per i principali batteri fitopatogeni delle specie ortive.
 Table 1 - PCR protocols for the main phytopathogenic bacteria in horticulture.

BATTERIO FITOPATOGENO	SPECIE OSPITE	GENE AMPLIFICATO (nome del gene per esteso e sua sigla)	SEQUENZA DEI PRIMERS (5'-3')	TIPO DI PCR	RIFERIMENTO BIBLIOGRAFICO
<i>Burkholderia cepacia</i> complex	<i>Allium cepa</i>	Recombinase A <i>RecA</i> amplicone 1043 pb	BCR1 5'-CTTGACCCGCCGAGAAGAGCAA-3' BCR2 5'-CTTCTTCTGTCATCGCCTC-3'	PCR	Pirone <i>et al.</i> , 2005
<i>Burkholderia gladioli</i> pv. <i>alliiicola</i>	<i>Allium cepa</i>	16S rDNA	fd1 5'-CCGAATTCGTCGACAAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3 rd1 5'-CCC GGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC-3'	PCR-RFLP	Segonds <i>et al.</i> , 1999
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	16S ribosomal RNA gene amplicone 820 pb	Cms A 5'-CGCACATCTCTGCACGTTTCC-3' Cms B 5'-CCCCGACTCTGGGATAACTGCTG-3'	PCR	Ahmed <i>et al.</i> , 2006
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Eric-Marker amplicone 306 pb	CffOR2 5'-GTTATGACTGAACCTCACTCC-3' CffREV4 5'-GATGTTCCCGGTTCAG-3'	Rep-PCR	Tegii 2002
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	metalloprotease-coding genes <i>proB</i> amplicone 450 pb	CHRREV 5'-AGTGCTGCCGTACAGCAGCT-3' ERWFOR 5'-ACGCATGAAATCGGCCATGC-3'	PCR	Smid <i>et al.</i> , 1995
<i>Erwinia herbicola</i>	<i>Allium cepa</i>		EH492F : 5'-GCTGCAAAACGCACAACA-3' EH550R : 5'-CGTGAACAAACGGCTCCA-3' EH512T (probe) :5'-CCGGCTTGAACCCCACTCC-3'	RT-PCR	Buttner <i>et al.</i> 2007
<i>Pectobacterium atrosepticum</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	Signal recognition particle protein <i>ffh</i> (FFH) amplicone 101 pb Recombinase A <i>recA</i> (RECA) Amplicone 101 pb	FFH F 5'-ATGGGCGATGTGCTTCTACT-3' FFH R 5'-TCAAACCCATCGCCTTCT-3' RECA F 5'-GGTGAGCTGGTTGATCTGGG-3' RECA R 5'-GCATTGCTTTACCCTGACC-3'	RT-PCR	Takle <i>et al.</i> , 2007
"	"	metalloprotease-coding genes <i>proB</i> (ATROREV-ERWFOR) amplicone 389 pb	ATROREV 5'-ATCGATAATTTGATTGCTCT-3' ERWFOR 5'-ACGCATGAAATCGGCCATGC-3'	PCR	Smid <i>et al.</i> , 1995
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	<i>Capsicum annuum</i> L.; <i>Solanum tuberosum</i> . <i>Cynara cardunculus</i> sp. <i>scolymus</i> L., <i>Daucus carota</i> L., <i>Cucumis sativus</i> , <i>Allium cepa</i> , <i>Foeniculum vulgare</i> , <i>Lactuca sativa</i> , <i>Cucumis melo</i> , <i>Capsicum annuum</i>	Pectate lyase <i>Pel</i> (Y1-Y2) Amplicone 434-pb	Y1 : 5'-TTACCGGACGCCGAGCTGTGGCGT-3' Y2 : 5'-CAGGAAGATGTCGTTATCGCGAGT-3'	PCR	Darrasse <i>et al.</i> , 1994
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	PSP specific phaseolotoxin gene	PsF-tox 188 : 5'-GGGTGGGACGTGTTAT-3' PsR-tox 557 : 5'GGCTGGCAGATTGATGTTCC-3' PsF-tox 286P (Probe) : 5'-ACCATCCGAATGCCAGTAATGCC-3'	RT-PCR	Schaad <i>et al.</i> , 2007
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	<i>Solanum lycopersicum</i> , <i>Phaseolus vulgaris</i>	type III effector HopAP1 <i>psyr_1890</i> amplicone 326 pb	PSS F 5'-TGTCATGGGCAACCTGACCCAAGC-3' PSS R 5'-TGGCGTTGAGCGATCTGAGC-3'	PCR	Vieira <i>et al.</i> , 2007
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	Hyper sensitive response proteine Z gene <i>hrpZ</i> amplicone 532 pb	MM5F 5'-GAACGAGCTGAAGGAAGACA-3' MM5R 5'-CAGCCTGGTTAGTCTGGTTA-3'	PCR	Zaccardelli <i>et al.</i> 2005
"	"	secreted hemolysin-type calcium-binding bacteriocin (PP2561), amplicone 484 pb auxin-responsive GH3-related gene (PSPTO2824) amplicone 200 pb	PP2561 F 5'-ACAATGTCAGCGCAACCAATGC-3' PP2561 R 5'-TCATCCACGTAGCTGACCATCAGC-3' PST2 F 5'-TGCACACTTACGCTCAATTGCAGC-3' PST2 R 5'-CTGGCGGTACATATCAGCCAGC-3'	PCR	Vieira <i>et al.</i> , 2007.
<i>Ralstonia solanacearum</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	RAPD-marker Amplicone 1100 pb	BP4-R 5'-GACGACATCATTTCACCGGGCG-3' BP4-L 5'-GGGTGAGATCGATTGTCTCCTTG-3'	PCR	Yung e Wang, 2000
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	Crucifere	type III secretion proteine <i>hrpF</i> gene amplicone 619 pb	DLH120 5'-CCGTAGCACTTAGTGCAATG-3' DLH125 5'-GCATTTCCATCGGTACGATTG-3'	PCR	Berg <i>et al.</i> , 2005
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	Crucifere	type III secretion proteine <i>hrcC</i> amplicone 519 pb	HRCR2 5'-CAGATCTGTCTGATCGGTGTCG-3' HRCF2 5'-CGTGTGGATGTGACAGCC-3'	PCR	Zaccardelli <i>et al.</i> , 2007
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	RAPD marker amplicone 730 pb	X4c : 5'-GGCAACACCCGATCCCTAAAACAGG-3' X4e : 5'-CGCCGGAAGCAGCATCTCCGAAG-3'	RAPD-PCR	Audy <i>et al.</i> , 1996
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	type III secretion protein <i>hrpB</i> , (RST2-RST3) amplicone 840 pb <i>hrpC</i> , (RST9-RST10) amplicone 355 pb <i>hrpD</i> (RST21-RST23) amplicone 1075 pb	RST2 5'-AGGCCCTGGAAGGTGCCTGGA-3' RST3 5'-ATCGCACTGCGTACCGCGCGCA-3' RST9 5'-GGCACTATGCAATGACTG3' RST10 5'-AATACGCTGGAAGTCTG-3' RST21 5'-GCACGCTCCAGATCAGCATCGAGG-3' RST22 5'-GGCATCTGCATGCGTCTCCGA-3'	PCR	Leite <i>et al.</i> , 1994
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vitians</i>	<i>Lactuca sativa</i>	RAPD marker Amplicone 700 pb	B1621f , 5'-CGGCCAATAATCAAGAGCA-3' B162r 5'-TTG TCC GTTACG ATT GGT GC-3'	PCR	Barak <i>et al.</i> , 2001

tali supporti inerti avviene la reazione antigene-anticorpo-enzima o composto fluorescente, che consente di stabilire la positività/negatività della diagnosi. In entrambi i casi, i tessuti vegetali vengono distrutti mediante macerazione in tampone; la sospensione che risulta dalla macerazione viene centrifugata, ed il concentrato finale (*pellet*) utilizzato per le analisi sierologiche. Opportune diluizioni in tampone del campione da saggiare permettono di ridurre od eliminare l'effetto di disturbo indotto da parte dei residui dei tessuti vegetali sia nei confronti del saggio colorimetrico (ELISA) che dell'osservazione finale al microscopio ottico a fluorescenza (IFA). Per alcuni batteri (es: *Xylella fastidiosa*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *C. m.* subsp. *Sepedonicus*, *Ralstonia solanacearum* biovar 2) esistono kit sierologici commerciali abbastanza affidabili per la diagnosi preliminare e/o di conferma (in caso si utilizzino primariamente le tecniche molecolari). In altri casi (es: *Xanthomonas fragariae*) l'utilizzo dei kit diagnostici non sempre dà risultati da considerare come definitivi.

Delle due tecniche, l'immunofluorescenza è stata di gran lunga quella più applicata nella batteriologia fitopatologica (tuttavia ottimo è il kit per la diagnosi mediante saggio ELISA della malattia di Pierce della Vite, causata da *Xylella fastidiosa*) ed ancora oggi viene utilizzata, parallelamente alle tecniche molecolari, nei protocolli diagnostici per verificare la presenza/assenza di batteri anche da quarantena. Infatti, il vantaggio di questa tecnica, è quello di mettere in evidenza, mediante colorazioni visibili sotto lampada epifluorescente a vapori di mercurio, eventuali cellule batteriche contenute nel *pellet* ed appartenenti alla specie target da individuare. Questa peculiarità, in alcuni casi, la fa preferire alle tecniche molecolari, soprattutto quando i protocolli di queste ultime non sono sufficientemente sperimentati e validati su larga scala.

Processamento dei campioni vegetali prima delle analisi

La diagnosi in fitobatteriologia è principalmente incentrata sulla ricerca dei batteri fitopatogeni nel materiale vegetale asintomatico impiegato per la propagazione delle piante (tuberi, semi, marze, piantine). Per fare ciò, è necessario che il campione vegetale venga opportunamente "processato", in modo da avere un estratto vegetale nel quale i batteri vengono concentrati a sufficienza per essere rilevati con metodi di detection tradizionali (ELISA, IFA) o molecolari (PCR, rt-PCR, nested-PCR, ibridazione con sonde molecolari).

In linea di massima, un campione vegetale da analizzare per la presenza di uno specifico batterio fitopatogeno subisce i seguenti trattamenti:

1. omogeneizzazione e macerazione del campione in apposito tampone. Questa viene realizzata impiegando dei frullatori oppure degli appositi strumenti denominati "stomacher" che, letteralmente, "schiacciano ripetutamente" il campione vegetale fino a ridurlo in poltiglia;
2. centrifugazione refrigerata a basso numero di giri. Questa centrifugazione ha lo scopo di eliminare, portandoli sul fondo della provetta da centrifuga,

i residui di frammenti vegetali e di lasciare in sospensione, nel supernatante, i batteri estratti;

3. centrifugazione refrigerata ad alto numero di giri. Questa centrifugazione ha lo scopo di concentrare i batteri presenti in sospensione nel supernatante, in un sedimento (denominato *pellet*) che va a depositarsi sul fondo della provetta. Al termine di questa centrifugazione, il supernatante residuo viene eliminato e il *pellet* risospeso in un volume molto ridotto di tampone.

A questo punto, aliquote del *pellet* possono essere utilizzate per la *detection* (tradizionale o molecolare) oppure per l'isolamento diretto su substrati semi-selettivi o, eventualmente, per l'inoculazione diretta in piante ospiti (test di patogenicità).

Procedure ufficiali di trattamento e analisi di campioni vegetali di varia origine, sono disponibili sui bollettini ufficiali dell' OEPP/EPPO e riguardano, ad esempio, il rilevamento di *Burkholderia caryophylli*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, *Erwinia amylovora*, *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*, *Ralstonia solanacearum* e *Xanthomonas fragariae*. Per la descrizione in dettaglio di questi protocolli, si rimanda alla bibliografia inserita in questo lavoro.

La diagnosi mediante PCR

La PCR (Polymerase Chain Reaction - reazione a catena della polimerasi) consiste nell'amplificazione, *in vitro*, di frammenti specifici di DNA dei quali si conoscono le sequenze nucleotidiche iniziali e terminali (inneschi o *primers*). Tale metodica fu ideata nel 1983 da Kary B. Mullis al quale venne conferito, per l'invenzione di questa tecnica, il Premio Nobel per la chimica. L'amplificazione mediante PCR consente di ottenere un'elevata quantità di DNA in rapidissimo tempo. Il processo di replicazione del DNA viene svolto, in natura, da enzimi della cellula chiamati DNA-polimerasi che, legando fra loro i nucleotidi nella corretta sequenza complementare al doppio filamento del DNA stampo, sono in grado di sintetizzare due nuovi filamenti.

Le fasi di un ciclo di PCR sono le seguenti:

1. Denaturazione, ovvero separazione dei due filamenti del DNA stampo. Questa fase avviene a temperature comprese tra i 94 °C e i 99°C.
2. *Annealing*, ovvero appaiamento degli inneschi (*primers*) all'estremità del filamento di DNA "stampo". Questa fase avviene ad una temperatura tra i 30 e i 65 °C.
3. Estensione, ovvero sintesi e allungamento del filamento di DNA complementare. Questa fase avviene ad una temperatura di 72 °C, ovvero alla temperatura ottimale per la *Taq* DNA polimerasi estratta dal batterio termofilo *Thermus aquaticus*. Alcune *Taq* polimerasi hanno una temperatura ottimale di 65 °C.
4. Terminazione, ovvero completamento del ciclo.

Il ciclo descritto viene ripetuto generalmente per circa 20-40 volte. Terminata la PCR, si procede alla corsa elettroforetica

Tabella 2 - Protocolli di PCR disponibili per i principali batteri fitopatogeni delle specie arboree e da frutto.
 Table 2 - PCR protocols for the main phytopathogenic bacteria of trees and fruit species.

BATTERIO FITOPATOGENO	SPECIE OSPITE	GENE AMPLIFICATO (nome del gene per esteso e sua sigla)	SEQUENZA DEI PRIMERS (5'-3')	TIPO DI PCR Classica o Real Time (rt)	RIFERIMENTO BIBLIOGRAFICO
<i>Agrobacterium</i> spp.	Ampio host range*	virD2 gene (endonucleasi) - amplicone 338 pb	A: ATGCCCGATCGAGCTCAAGT E': CCTGACCCAAACATCTCGGGTCCCA	PCR	Haas <i>et al.</i> , 1995
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	varie*	isopentenil trasferasi ipt gene - amplicone 427 pb	CYT: GAT CG(G)GTCCAATG(C/T)TGT CYT': GATATCCATCGATC(T/C)CTT	PCR	Haas <i>et al.</i> , 1995
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	varie	virC gene - amplicone 730 pb	VCF: ATCATTTGTAGCGACT VCR: AGCTCAAACCTGCTTC	PCR	Sawada <i>et al.</i> , 1995
<i>Agrobacterium</i>	melo	virC gene - amplicone 414 pb	VCF3: GCGGGGCGYGCYGAAGRAARACYT VCR3: AAGAACYGGNATGTTGCATCTYAC	PCR	Suzaki <i>et al.</i> , 2004
<i>A. vitis</i> , <i>A. rubi</i> , <i>A. tumefaciens</i>	varie	23S rRNA gene - ampliconi di 478, 1006 e 184 pb, rispettivamente per <i>A. vitis</i> , <i>A. rubi</i> , <i>Agrobacterium biovar 1</i>	UF f: GTAAGAAGCGAAGCGAGGGA B1R r: GACAATGACTGTTCTACCGCTAA B2R r: TCCGATACCTCCAGGGCCCTCACA AvR r: AACTAACAATCCGCGCTAATAAC ArR r: AAAACAGCCACTACGACTGTCT	Multiplex-PCR	Pulawska <i>et al.</i> , 2006
<i>A. vitis</i> , <i>A. rubi</i> , <i>A. tumefaciens</i>	pesco, crisantemo	regione intercristronica compresa fra i geni di virulenza virB e virG del plasmide Ti- amplicone 246 pb	FGPvirB ₁₁₋₂₁ : TGCCGCATGGCGGTGTAG FGPvirG15': GAACGTGTTCAACGGTTCA	PCR	Puopolo <i>et al.</i> , 2007
<i>Brenneria nigrifluens</i>	Noce	M13-Marker di 1kb - amplicone 250 pb	F1: CCTGCGCCATGTTGCCAGATGCTAT C3: ACCTGAGTAGCAGTTTCGACTATT	PCR	Loreti <i>et al.</i> , 2006a
<i>Erwinia amylovora</i>	Rosaceae	plasmide pEA29 - amplicone 0.9kb*	Primer A: CGG TTT TTAACGCTGGG Primer B: GGGCAAATACTCGGATT	PCR	Bereswill <i>et al.</i> , 1992
<i>Erwinia amylovora</i>	Rosaceae	plasmide pEA29 - amplicone 0.8 kb	Inneschi esterni A: CGGTTTTTAAACGCTGGG B: GGGCAAATACTCGGATT Inneschi interni AJ75: CGTATTCACGGCTTCGCAGAT AJ76: ACCCGCCAGGATAGTCGCATA	Nested-PCR	McManus e Jones, 1995
<i>Erwinia amylovora</i>	Rosaceae	plasmide pEA29 - ampliconi di dimensioni variabili (391 pb o 441 pb**)	Inneschi AJ75-76 di McManus and Jones (1995) + nested PCR con inneschi interni PEANT1: TATCCCTAAAAACCTCAGTGC PEANT2: GCAACCTGTGCCCTTTA	Nested-PCR	Llop <i>et al.</i> , 2000
<i>Erwinia amylovora</i>	Rosaceae	plasmide pEA29 - 111 pb	E3: AAGACATCCGGCTTCTGAAA Scorpion E4: GGATTACGGGATGACAAGA Inneschi esterni (PEANT1-2) di Llop <i>et al.</i> , 2000 + nested rt PCR con inneschi interni e E3 e Scorpion E4	scorpion rt-PCR nested scorpion rt-PCR	De Bellis <i>et al.</i> , 2007
<i>Erwinia amylovora</i>	Rosaceae	23S rDNA - amplicone 565 pb	EaF: GCGCAGTAAAGGGTGACAGCCCGTACACAAAAGGCACT EaR: CCCTAGCCGAAACAGTGCCTACCCCGG	PCR	Maes <i>et al.</i> , 1996
<i>Erwinia amylovora</i>	Rosaceae	plasmide pEA29 - amplicone 112 pb	P29TF: CACTGATGGTCCGCTTG P29TR: CGCCAGGATAGTCGCATA P29TM (probe): TACCTCCGAGCCGCTATGG	rt-PCR	Salm e Geider, 2004
<i>Erwinia amylovora</i>	Rosaceae	amylovoran synthesis region <i>amsJ/amsK</i> gene - amplicone 600 pb	AMSK14258: TTACTGCAGAGCTGCTC AMSK14892c: ATCTTCTCCGCGGACA AMSK14819: AACGAGTGTGCTGCTACC AMSK14948c: CATCGCTAGCTTAAGG AMSK14840 (probe): AGCCGTCTGGCAGCACA	PCR e rt-PCR	Mohammadi <i>et al.</i> , 2009
<i>Erwinia amylovora</i>	Rosaceae	plasmide pEA29	P29TF761: CACTGATGGTCCGCTTG P29TR872: CGCCAGGATAGTCGCATA P29TM782 (probe): TACCTCCGAGCCGCTATGG	rt-PCR	Mohammadi <i>et al.</i> , 2009
<i>Pseudomonas avellanae</i>	Nocciolo	16S rDNA gene - amplicone 762 pb	PAV1: GCGCAGATCCGTAAGTGGTCTGAGA PAV 22: TTCCGAAAGGCACTCCTATCTCTAAAG	PCR	Scorticini e Marchesi, 2001.
<i>Pseudomonas avellanae</i>	Nocciolo	hypersensitive response and pathogenicity <i>hrpW</i> gene - amplicone 350 pb	WA: TCCACAGGACGCCCAAGA WC: TGCGGTGTTACGCCACCATC	PCR	Loreti e Gallelli, 2002
<i>Pseudomonas avellanae</i>	Nocciolo	16S rDNA gene - amplicone 82 pb.	Pavel-F: GCACTTTAAGTTGGGAGGAA Pavel R: CAGAGTTAGCGGTGCTTA Pavel-MGB Probe: AATACGTATCTGTTTG-MGB**	rt-PCR	Gervasi e Scorticini, 2009

in gel di agarosio dei prodotti di amplificazione e alla loro visualizzazione, previa colorazione con bromuro di etidio, alla luce UV del transilluminatore (Fig. 1).

La scelta dei primers da utilizzare costituisce un aspetto essenziale per la buona riuscita della PCR. Essi, infatti, devono potersi ibridare in maniera specifica ed efficiente alla sequenza di interesse, tralasciando quelle aspecifiche. La concentrazione di magnesio è, senza dubbio, il secondo fattore più critico della PCR. Questo fattore deve essere ben ottimizzato, in quanto la concentrazione di magnesio condiziona l'attività della DNA-polimerasi, l'ibridazione dei primers e la temperatura di denaturazione del DNA. La variazione di concentrazione di Mg²⁺ ha un ruolo simile a quello della temperatura di annealing, influenzando il livello di stringenza (specificità) della PCR. La concentrazione ottimale di questo ione può variare anche se si utilizzano primers diversi per amplificare una medesima regione di DNA. Un terzo fattore da considerare è la presenza, soprattutto se si vuole amplificare del DNA estratto da tessuti vegetali, di sostanze naturali inibitrici dell'amplificazione (metalli pesanti, proteine, complessi polisaccaridici, sostanze fenoliche) fatto, questo, che può portare ad avere dei "falsi negativi". Per questo motivo, i tamponi aggiunti alle miscele di amplificazione contengono specifiche sostanze che minimizzano l'effetto degli inibitori della PCR.

Dato che la presenza di quantità infinitesime di DNA contaminante appartenente alla specie target può determinare la comparsa dei così detti "falsi positivi", con conseguenti errori di diagnosi, un aspetto molto importante e che non deve essere assolutamente trascurato riguarda le condizioni di pulizia degli ambienti e di tutte le attrezzature che vengono impiegate per eseguire la PCR, nonché l'adozione di opportune misure di prevenzione e di controllo (separazione degli ambienti dove si preparano le reazioni di PCR da quelli dove vengono fatti migrare e visualizzare gli amplificati, ripartizione in aliquote dei reagenti, impiego di pipette dedicate al prelievo del DNA distinte da quelle dedicate al prelievo dei reagenti di PCR, uso di puntali con filtro ecc.).

Un altro accorgimento è quello di porre particolare attenzione nello stoccaggio e impiego del bromuro di etidio per la colorazione dei gel, in quanto cancerogeno. Attualmente è in commercio un'altra sostanza colorante (SYBR® Safe DNA gel stain) molto meno dannosa per la salute. Sebbene le tradizionali tecniche microbiologiche e immunologiche abbiano, a tutt'oggi, un importante ruolo nella diagnostica fitopatologica, la PCR qualitativa ha facilitato grandemente lo screening massivo di molti patogeni vegetali. L'avvento della PCR, ha, infatti, influenzato le scienze applicate, fra cui la diagnostica dei batteri fitopatogeni. Attualmente il "Laboratory guide for

Tabella 2 - Protocolli di PCR disponibili per i principali batteri fitopatogeni delle specie arboree e da frutto.
 Table 2 - PCR protocols for the main phytopathogenic bacteria of trees and fruit species.

BATTERIO FITOPATOGENO	SPECIE OSPITE	GENE AMPLIFICATO (nome del gene per esteso e sua sigla)	SEQUENZA DEI PRIMERS (5'-3')	TIPO DI PCR Classica o Real Time (rt)	RIFERIMENTO BIBLIOGRAFICO
<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	Oliivo	indoleacetic acid-lysine synthetase <i>iaaL</i> gene	IAALF: GGCACCAGCGGCAACATCAA IAALR: CGCCTCGGAATGCCATAC		Penyalver <i>et al.</i> , 2000
<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	Oliivo		Inneschi esterni: IAALF/IAALR (Penyalver <i>et al.</i> , 2000) Inneschi interni IAALN1: CTCCTCTCCAACGCTCTC IAALN2: GCCTGATGATT TCTCTG	Nested-PCR	Bertolini <i>et al.</i> , 2002
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	Agrumi	Frammento EcoRI di 572pb di DNA plasmidico - amplicone 222 pb	primer 2: CACGGGTGCAAAAATCT primer 3: TGGTGTCTGCTCGTTGAT	PCR	Hartung <i>et al.</i> , 1993
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	Agrumi	effector <i>pthA</i> gene - amplicone 197 pb	J- <i>pth1</i> : CTTCAACTCAAACGCCGGAC- J- <i>pth2</i> : CATCGCGCTGTCCGGGAG	PCR	Cubero e Graham, 2002
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	Agrumi	Intergenic spacer region (ITS)-Marker amplicone 179 bp	J-Rxg : GCCTGTAGGCTGAGACATG J-RXc2: CAAGTTGCCTCGGAGCATC	PCR	Cubero e Graham, 2002
<i>Xanthomonas fragariae</i>	Fragola	RAPD-Marker - ampliconi 300, 550 e 615 bp	241 A: GCC CGA CGC GAG TTG AATC 241 B: GCC CGA CGC GCT ACA GAC TC 245 A: CGC GTG CCA GTG GAG ATC C 245 B: CGC GTG CCA GAA CTA GCA G 295 A: CGT TCC TGG CCG ATT AAT AG 295 B: CGC GTT CCT GCG TTT TTT CG	Multiplex-PCR	Pooler <i>et al.</i> , 1996
<i>Xanthomonas fragariae</i>	Fragola	amplicone di 286 pb	Inneschi esterni 245 A e B di Pooler <i>et al.</i> (1996) Inneschi interni 245.5: GTTCCAGTGGAGATCCTGTG 245.267: GTTTTCGTTACGCTGAGTACTG	Nested-PCR	Zimmermann <i>et al.</i> , 2004
<i>Xanthomonas fragariae</i>	Fragola	prodotti di amplificazione 241, 245, 295 secondo PCR di Pooler <i>et al.</i> (1996)- ampliconi 60 bp, 65 bp, 70 bp	q241f: GCCCGACGCGAGTTGAATC q241r: GGTCGAAAGTTACCGCCA probe: AGCATCTCCAAGCGAATGC q245f: TTCTGTCCGAGAAATGTCCA q245r: CGGTGCCAGAACTAGCAG probe: TTCGTTACGCTGAGTACTACTGG q295f: CGTTCCTGGCCGATTAATAG q295r: GTAATTTTCAGTTGGTGATTA probe: AAGCGACAAAGAAATGAAACCG	rt-PCR	Turechek <i>et al.</i> , 2008
<i>Xanthomonas fragariae</i>	Fragola	prodotto di 550 bp (Pooler <i>et al.</i> , 1996) – amplicone 41 pb	Xfr-QPCR-241-f: CTTTCCGCGCGGAT Xfr-QPCR-241-r: TCGGTGATTGCGAATCTGC Xfr-QPCR-241-probe: AGTCCCAATGAACCAACGAGCAGCA	rt-PCR	Vandroemme <i>et al.</i> , 2008
<i>Xanthomonas fragariae</i>	Fragola	hypersensitive response <i>hrp</i> gene – amplicone 537 bp	Inneschi esterni XF9: TGGCCATGCCGGTGAACCTGTGTGG XF11: TACCCAGCGCTCGCAGACGACCGG Inneschi interni XF9 + XF12: TCCCCAGCAACCCAGATCCG	PCR semi nested-PCR	Roberts <i>et al.</i> , 1996
<i>Xanthomonas fragariae</i>	Fragola	gyrase <i>gyrB</i> gene – amplicone 129 pb	Xf <i>gyrB</i> -F: CCGCAGCGACGCTGATC Xf <i>gyrB</i> -R: ACGCCATTGGCAACACTTGA Xf <i>gyrB</i> -P: TCCGCGGACACATGGCGAAGAATTC	rt-PCR	Weller <i>et al.</i> , 2007
<i>Xylella fastidiosa</i>	Pero	Marker di 1412 pb con random primer OPA11 - amplicone 416 p	PLS-F: TGGACGTTGTGGTATCGGTTG PLS-R: TTGAAGTTGACGTGTGGCTG	PCR	Su <i>et al.</i> , 2008
<i>Xylella fastidiosa</i>	Vite	Marker di 7,4 kb di DNA genomico - amplicone 733 bp	RST31:CGCTTAATTTTCGAAGTGATTCTGATTGC RST33:CAACCTTCGATCCCGGTC	PCR	Minsavage <i>et al.</i> , 1994
<i>Xylella fastidiosa</i>	Agrumi	RAPD-Marker di 700 pb- amplicone 500 pb	CVC-1: AGATGAAAACAATCATGCAAA 272-2-int: GCGCTTCGGAGAGATTCTCT	PCR	Pooler e Hartung, 1995
<i>Xylella fastidiosa</i>	Varie	16S rRNA gene – ampliconi 1348, 745, 603 pb gyrase <i>gyrB</i> gene– amplicone 429 pb	S-S-X.fas-0067-a-S-19 CGGCAGCACATTTGGT AGTA S-S-X.fas-0838-a-S-21 GCAAAATGGCACTCAGTATCG S-S-X.fas-0838-a-A-21 CGATACTGAGTGCCA ATTTGC S-S-X.fas-1439-a-A-19 CTCTCCGCGGTTAAGCTA C FXygyr499 CAG TTA GGG GTG TCA GCG RXygyr907 CTC AAT GTA ATT ACC CAA GGT	Multiplex-PCR	Rodrigues <i>et al.</i> , 2003
<i>Xylella fastidiosa</i>	Vite	frammento RAPD DNA genomico- amplicone 779-bp	XF176f: AAACAATCACAGGGGACTGC XF954: AGCTGCCTTAGATACITATA	PCR	Banks <i>et al.</i> , 1999
<i>Xylella fastidiosa</i>	Vite	ITS region 16S rRNA gene	ITS forward primer XIF1: AAAAAATCGCCAACATAAAACA ITS reverse primer XIR1: CCAGGCGTCTCACAAAGTTAC ITS probe XIP1:ACCTATGCCAACATCAAACCCCTGAATGCA 16S forward primer XIF2: CTCGCCACCCATGGTATTACTAC 16S reverse primer XIR2: CTGGCGCAGGCCAATC 16S probe XIP2: ATGTGCTGCCGCTCGACTGTGCATG	rt-PCR	Schaad <i>et al.</i> , 2002
<i>Xylella fastidiosa</i>	Vite, mandorlo, agrumi, oleandro	Regione DNA specifica (scelta in silico da genoma sequenziato) amplicone 221 pb	HL5: AGGCAATAAACCGCGCACTA HL6: GGTTTTGTGACTGGCAACA Probe:TGGCAGGCAGCAACGATACGGCT	PCR and rt-PCR	Francis <i>et al.</i> , 2006

identification of plant pathogenic bacteria” (Schaad *et al.*, 2001), include primers per l’identificazione, mediante PCR, di circa 20 diversi batteri fitopatogeni. Tuttavia, sebbene i primi protocolli basati sulla PCR per la diagnosi e l’identificazione di patogeni vegetali in piante infette (Rassunsen and Wullf, 1991) o in semi infetti (Prosen *et al.*, 1991) risalga a oltre 10 anni fa, la loro applicazione nei laboratori diagnostici che operano in campo vegetale era, almeno fino ad alcuni anni fa, ancora limitato (Schaad and Frederick, 2002). In alcuni pato-sistemi, uno dei motivi è dovuto al fatto che la PCR convenzionale spesso non risulta più sensibile dell’ELISA e, soprattutto, dell’IFA; talvolta, è addirittura meno sensibile dell’isolamento su terreno semiselettivo (Wang *et al.*, 1999). In una reazione di PCR il processo di amplificazione non procede indefinitamente, essendo limitato da diverse variabili (es. dalla quantità di

primers, dei nucleotidi, dall’attività della *Taq* polimerasi), per cui raggiunta la fase di plateau (successiva alla fase esponenziale) non si osserva più un incremento del prodotto di amplificazione. Soprattutto al fine di limitare al massimo i suddetti inconvenienti, negli ultimissimi anni si sta diffondendo la PCR “quantitativa”, conosciuta anche con il nome di real-time PCR (rt-PCR).

La diagnosi mediante Real Time-PCR.

Rispetto alla PCR convenzionale, la rt-PCR ha il vantaggio di misurare l’amplificazione in tempo reale durante la fase esponenziale della reazione, quando cioè l’efficienza di amplificazione è influenzata minimamente dalle variabili di reazione, permettendo di ottenere risultati molto più accurati (Fig. 2). Questo è reso possibile mediante il rilevamento di una fluorescenza, durante l’elongazione delle molecole di

DNA, che è proporzionale all'aumento del numero di copie dell'amplicone il quale, a sua volta, sarà proporzionale al template iniziale. La fluorescenza viene rilevata, durante ogni ciclo di amplificazione, utilizzando dei marcatori il cui accumulo segue la stessa cinetica della reazione di PCR.

Diverse sono le possibili reazioni chimiche che generano la fluorescenza durante la PCR. Le principali sono basate o sul legame di coloranti fluorescenti che si legano alla doppia elica di DNA, come il SYBR Green, o sull'ibridazione di sonde specifiche. Il sistema SYBR Green utilizza una molecola fluorescente non specifica che si lega al solco minore del DNA e che emette fluorescenza circa 200 volte più vivacemente quando è legata alla doppia elica (dsDNA); per confronto il bromuro d'etidio, un'altra molecola intercalante, emette una fluorescenza di circa 25 volte più intensamente nella dsDNA (Higuchi *et al.*, 1993).

I vantaggi sono rappresentati dal fatto che è una metodica semplice che può utilizzare inneschi in uso in PCR convenzionale e, inoltre, non è costosa. Tuttavia, non è molto specifica: infatti, la molecola fluorescente si lega in maniera casuale a tutte le doppie eliche, includendo i dimeri dei *primer*; ciò rende necessario ottimizzare la metodica per evitare la formazione di prodotti aspecifici. Questo viene realizzato sottoponendo i campioni, al termine dell'amplificazione, ad un graduale aumento di temperatura fino al raggiungimento della cosiddetta temperatura di *melting* (T_m), ovvero la temperatura alla quale la doppia elica di DNA si separa in due eliche. La variazione dell'energia di fluorescenza viene così monitorata per generare una curva di dissociazione, la cosiddetta "curva di *melting*". In questo modo è possibile individuare, come picchi differenti, quelli generati dal prodotto di amplificazione specifico, da quelli aspecifici e/o dai dimeri di primers.

Fra i sistemi basati sull'ibridazione di sonde specifiche si ricordano i metodi "dual-labeled" (es. TaqMan[®]), "fluorescence resonance energy transfer" (FRET), "Scorpion" e "Molecular beacons". Il metodo TaqMan[®], fra i tre il più utilizzato, sfrutta l'attività 5' esonucleasica della *Taq* DNA polimerasi insieme all'utilizzo di specifiche sonde di DNA marcate con molecole fluorescenti e inneschi specifici. La sonda, complementare ad un tratto della sequenza del DNA bersaglio e generalmente di dimensioni variabili fra i 25 e i 30 nucleotidi, viene marcata all'estremità 5' con un fluorocromo "reporter" e all'estremità 3' con una molecola "quencher". La vicinanza del *quencher* al *reporter* impedisce l'emissione di fluorescenza da parte di quest'ultimo. Durante la reazione di amplificazione l'attività esonucleasica 5'-3' della *Taq* polimerasi degraderà la sonda liberando il *reporter*, separandolo fisicamente dal *quencher*. All'amplificazione esponenziale del prodotto corrisponderà un incremento progressivo dell'intensità di fluorescenza. Svariate sono le molecole fluorescenti *reporter* (TET, JOE, HEX, CY3, Texas Red, CY5, LC 640) fra le quali la più utilizzata è FAM, generalmente in accoppiamento con il *quencher* TAMRA che, tuttavia, essendo esso stesso un fluoroforo, può dare "rumore di fondo" riducendo la nitidezza del segnale. Altri *quencher* disponibili in commercio sono BHQ 1, BHQ 2, BHQ 3.

Inoltre, attraverso l'utilizzo contemporaneo di fluorofori diversi è possibile la messa a punto di *real-time multiplex* utili per il rilevamento, in contemporanea, di più patogeni batterici. Un accurato studio preliminare è necessario in fase di scelta delle sequenze degli inneschi e della sonda, ai fini di un'ottimale riuscita della *rt-PCR*, e in particolare, della *real-time multiplex*. Il metodo TaqMan[®], pur presentando costi più elevati del SYBR Green, ha il vantaggio di essere molto specifico, mantenendo caratteristiche di sensibilità e rapidità di esecuzione.

Un'altra importante possibilità offerta da questa metodica, indipendentemente dal tipo di sistema scelto, è quella di poter quantificare il prodotto di amplificazione. La quantificazione può essere assoluta, e in questo caso il *target* è quantizzato attraverso l'utilizzo di una curva *standard* di titolazione, oppure relativa, se la quantizzazione avviene attraverso il confronto con un gene costitutivo. Infine, attualmente sono disponibili termociclatori portatili che rendono possibile la diagnosi in pieno campo o in punti "critici" come la dogana addirittura in un'ora (Schaad *et al.*, 2002).

In generale, al di là del tipo di sistema scelto, i principali vantaggi della *rt-PCR* possono riassumersi in:

- possibilità di quantificazione del prodotto (la PCR convenzionale è solo qualitativa);
- analisi del prodotto di fluorescenza tramite computer: eliminazione di passaggi successivi alla PCR (corsa su gel di agarosio e colorazione);
- facilità di automazione della tecnica;
- velocità di esecuzione;
- processamento su larga scala di campioni.

Protocolli di PCR e *real time-PCR* disponibili per la ricerca di batteri fitopatogeni in orticoltura

I patogeni delle specie ortive sono stati da sempre oggetto di identificazione mediante metodi sierologici, biochimici e, negli ultimi anni, molecolari. Con l'avvento di nuove metodiche di amplificazione (RAPD-PCR, nested-PCR, BIO-PCR, *rt-PCR*) la diagnosi è risultata sempre più semplice e rapida, permettendo l'individuazione e l'identificazione di patogeni anche da materiale asintomatico o con una bassissima carica di inoculo. Questo risulta particolarmente importante quando l'identificazione mediante metodi tradizionali, sierologici e biochimici è difficile e lunga o porta a scarsi risultati. I patogeni maggiormente indagati e per i quali è presente una vasta bibliografia sono le specie appartenenti ai generi ad ampio host-range, quali *Pectobacterium* e *Burkholderia*. Nella tabella 1 sono indicati i principali batteri fitopatogeni delle specie ortive con le rispettive referenze bibliografiche e specifiche (sequenza dei primers, dimensioni dell'amplicone, sequenza bersaglio) per quanto riguarda la loro identificazione mediante le tecniche di PCR.

Protocolli di PCR e *real time-PCR* disponibili per la ricerca di batteri fitopatogeni in frutticoltura

Attualmente sono disponibili in bibliografia vari protocolli di PCR qualitativa e quantitativa messi a punto per la diagnosi di batteri agenti causali di malattia su fruttiferi e specie arboree.

Per alcuni batteri fitopatogeni, e in particolare per quelli da quarantena o soggetti a normative fitosanitarie, come ad es. *Erwinia amylovora*, *Xanthomonas fragariae*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, *Xylella fastidiosa*, *Agrobacterium* spp., si è assistito nel tempo ad una progressiva evoluzione delle metodiche di diagnosi basate sulla PCR e sull'uso di inneschi e/o sonde specifiche (es nested-PCR, *rt*-PCR). Ciò ha consentito di ottimizzare la diagnosi rendendola sempre più specifica, sensibile e rapida permettendo, ad esempio, di processare campioni direttamente in campo in meno di un'ora (Schaad *et al.*, 2002) o di individuare la presenza del batterio anche in materiale infetto asintomatico (Bertolini *et al.*, 2003; Llop *et al.*, 2000; Puopolo *et al.*, 2007; Zimmermann *et al.*, 2004). Nella tabella 2 sono riportati le referenze bibliografiche con le specifiche (sequenza dei primers, dimensioni dell'amplicone, sequenza bersaglio) del protocollo pubblicato relativi a vari batteri fitopatogeni di specie arboree.

Cenni di legislazione fitosanitaria inerente la diagnosi in fitobatterologia

La normativa vigente in materia di batteriologia fitopatologica regola soprattutto il contenimento della diffusione e l'eradicazione dei batteri da quarantena.

Il Decreto Ministeriale del 26 settembre 2006 recepisce la Direttiva 2000/29/CE del Consiglio e successive modifiche, concernente le misure di protezione contro l'introduzione di organismi nocivi ai vegetali o ai prodotti vegetali e contro la loro diffusione nella Comunità Europea. Gli allegati di tale decreto individuano gli organismi nocivi e i prodotti vegetali da controllare in tutta la Comunità Europea o solo in talune zone.

Per quanto riguarda le sole specie batteriche, si individuano pertanto:

- *Xylella fastidiosa*: organismo nocivo non presente sul territorio comunitario, di cui deve essere vietata l'introduzione o la diffusione in tutti gli stati membri;
- *Ralstonia solanacearum* e *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*: organismi nocivi, già presenti sul territorio comunitario, di cui deve essere vietata l'introduzione o la diffusione in tutti gli stati membri;
- Citrus greening bacterium, Citrus variegated chlorosis e tutti i ceppi patogeni per *Citrus* di *Xanthomonas campestris*: non presenti sul territorio comunitario, per i quali è vietata l'introduzione e la diffusione in tutti gli stati membri se presenti su alcune specie di agrumi;
- *Erwinia stewartii* e *Xanthomonas campestris* pv. *orzae*: non presenti sul territorio comunitario, per i quali è vietata l'introduzione e la diffusione in tutti gli stati membri se presenti su sementi rispettivamente di *Zea mais* e *Oryza* spp.;
- *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus* e *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*: già presenti sul territorio comunitario, per i quali è vietata l'introduzione e la diffusione in tutti gli stati membri se presenti su sementi rispettivamente di *Medicago sativa* e *Phaseolus*;
- *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*,

Erwinia chrysanthemi pv. *dianthicola*, *Pseudomonas caryophylli*, *Pseudomonas syringae* pv. *persicae*, *Xanthomonas campestris* pv. *pruni*, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, *Xanthomonas fragariae*, *Xylophylus ampelinus* e *Erwinia amylovora*: già presenti sul territorio comunitario, per i quali è vietata l'introduzione e la diffusione in tutti gli stati membri se presenti su materiali destinati alla piantagione, ad esclusione delle sementi.

- *Curtobacterium flaccumfaciens* e *Erwinia amylovora*: batteri per i quali deve essere vietata l'introduzione, se presenti su determinati tessuti vegetali, in zone protette ben definite.

Nonostante il cospicuo numero di specie batteriche da quarantena, protocolli ufficiali di diagnosi sono stati redatti solo per *E. amylovora* (Direttiva 2003/116/CE della Commissione del 4/12/2003), *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Decisione della Commissione del 6/12/2005, 2005/870/CE) e per *R. solanacearum* (Direttiva 2006/63/CE della Commissione del 14/7/2006).

Protocolli di diagnosi validati, sono stati pubblicati dall'European and Mediterranean Plant Protection Organisation (EPPO) (www.eppo.org). In particolare, nell'ambito delle specie batteriche appartenenti alla lista A1, che comprende organismi presenti sui territori dei Paesi aderenti all'EPPO, sono stati pubblicati protocolli di diagnosi per: *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* e *Xylella fastidiosa*. Per le specie appartenenti alla lista A2, lista che comprende organismi già diffusi in alcune zone dei Paesi EPPO, sono disponibili protocolli per le specie: *Burkholderia caryophylli*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, *C. m.* subsp. *michiganensis*, *Erwinia amylovora*, *Pantoea stewartii*, *Pseudomonas syringae* pv. *persicae*, *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina*, *X. a.* pv. *pruni*, *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* e *X. fragariae*.

Oltre ai patogeni da quarantena, la normativa comunitaria prevede il contenimento di alcuni patogeni di qualità, ossia di quei patogeni che compromettono il valore commerciale delle produzioni ma che sono, ormai, ampiamente diffusi nei territori comunitari.

Per quanto riguarda i batteri trasmissibili per seme, la loro diffusione viene solo vagamente contemplata dalla normativa sementiera. La legge n. 1096 del 25 novembre 1971 e successive modifiche e integrazioni, cita semplicemente che "la presenza di malattie e di organismi nocivi che riducano il valore di utilizzazione delle sementi non è tollerata che in misura più limitata possibile". L'unica specie batterica considerata da tale normativa è *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* che deve essere controllata su semi di soia. Nulla viene puntualizzato, però, relativamente a soglie di tolleranze o procedure di diagnosi.

Per la ricerca dei batteri di qualità dei semi sono oggi disponibili protocolli standard di diagnosi, redatti dall'ISTA (International Seed Testing Association) e dall'ISHI (International Seed Health Initiative). In dettaglio, i protocolli riportati dall'ISHI forniscono linee guida per la ricerca di *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, su fagiolo; *Xanthomonas*

campestris pv. *campestris* su *Brassica* spp.; *X. hortorum* pv. *carotae* su carota; *X. c.* pv. *vesicatoria* su peperone e pomodoro; *C. m.* subsp. *michiganensis* su pomodoro; *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* su anguria.

Infine, per quanto riguarda i patogeni di qualità presenti sul materiale di propagazione di specie ortive e arboree, ad eccezione delle sementi, sono in vigore i Decreti Ministeriali del 14/04/1997. Queste norme stabiliscono che il materiale di propagazione deve essere “all’esame visivo, sostanzialmente privo di organismi nocivi o malattie pregiudizievoli alla qualità, nonché di loro sintomi che limitino la possibilità di utilizzarlo come materiale di moltiplicazione” “in particolare, deve essere privo degli organismi o delle malattie”; queste ultime, sono quelle elencate negli allegati ai decreti stessi. Negli elenchi vengono indicate molte specie del genere *Pseudomonas* e *Xanthomonas*, nonché *Erwinia carotovora* e *Agrobacterium tumefaciens*; anche in questo caso, non viene specificato nulla rispetto alle soglie di tolleranze o alle metodologie di diagnosi da adottare.

Il futuro della diagnosi molecolare in fitobatteriologia.

Oggi sempre di più sono le informazioni disponibili, nelle banche dati, sulle sequenze dei genomi batterici, compresi quelli fitopatogeni (es. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Xylella fastidiosa*). Lavori di genomica comparativa tra batteri fitopatogeni molto simili, ma che presentano un diverso range di piante ospiti, vengono sempre maggiormente pubblicati. Questi lavori consentono di individuare sequenze di DNA patovar-specifiche, permettendo il chiarimento delle basi genetiche della specificità delle interazioni ospite-patogeno in fitobatteriologia. Queste sequenze, una volta individuate, possono essere utilmente impiegate nella *detection* molecolare dei batteri fitopatogeni. Molte di queste sequenze riguardano geni effettori, i quali hanno un ruolo chiave nella determinazione della patogenicità e della virulenza (Zaccardelli *et al.*, 2005; Zaccardelli *et al.*, 2007; Loreti *et al.*, 2003; Loreti *et al.*, 2008b; Yan *et al.*, 2008).

L’abbassamento esponenziale dei costi dei sequenziamenti dei genomi, grazie allo sviluppo di tecnologie sempre più rapide ed efficienti, porteranno sicuramente ad un maggiore sviluppo della *detection* basata sull’amplificazione del DNA. Proprio a causa del drastico abbassamento dei costi non è utopistico che possa diffondersi, nei prossimi anni, l’identificazione basata sul sequenziamento automatico di grossi porzioni del cromosoma batterico patovar-specifiche.

Riassunto

La diagnosi in batteriologia fitopatologia ha subito, in questi ultimi anni, una profonda evoluzione grazie alla diffusione della PCR e della *real time*-PCR. Ormai tutti i batteri fitopatogeni di maggiore interesse in orticoltura e in frutticoltura possono essere rilevati mediante PCR convenzionale. Inoltre, sempre più protocolli di *real time*-PCR, aventi per oggetto l’identificazione di batteri

fitopatogeni, vengono pubblicati consentendo, pertanto, anche la quantificazione degli stessi nelle diverse matrici vegetali infette. Questo contributo ha lo scopo di illustrare i principi delle due tecniche, la disponibilità di protocolli di PCR e *real time*-PCR per il rilevamento dei più importanti batteri fitopatogeni in orticoltura e in frutticoltura e la situazione legislativa fitosanitaria sulla diagnosi in fitobatteriologia. Infine, vengono brevemente illustrati i metodi diagnostici convenzionali attualmente ancora impiegati nei laboratori di fitobatteriologia e quelli che si propongono nel prossimo futuro.

Parole chiave: batteri, PCR, *rt*-PCR, sequenziamento

Summary

Advanced detection methods in phytobacteriology

Diagnosis in phytobacteriology has showed, in these last years, an heavy evolution, due to diffusion of PCR and real time-PCR. All phytopathogenic bacteria important in horticulture, can be revealed by conventional PCR. Moreover, real time-PCR protocols are available for identification of phytopathogenic bacteria, allowing to quantify microorganisms in different infected plant samples. Aim of this contribute is to illustrate principles of these two techniques, availability of PCR and real time-PCR protocols for the detection of the most important phytopathogenic bacteria in vegetable culture and, moreover, legislative phytosanitary situation about diagnosis in phytobacteriology. Finally, briefly are illustrated conventional diagnostics methods actually used in phytobacteriology laboratories and detection methods proposed in the next future. PCR based protocols are available, in horticulture, for detection of Burkholderia cepacia, Burkholderia gladioli pv. alliiicola, Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus, Curtobacterium flaccumfaciens pv. flaccumfaciens, Erwinia chrysantemi, Erwinia herbicola, Pectobacterium atrosepticum, Pectobacterium carotovorum pv. carotovorum, Pseudomonas syringae pv. phaseolicola, Pseudomonas syringae pv. syringae, Pseudomonas syringae pv. tomato, Ralstonia solanacearum, Xanthomonas campestris pv. campestris, Xanthomonas campestris pv. phaseoli, Xanthomonas campestris pv. vesicatoria, Xanthomonas campestris pv. vitians. PCR based protocols are available, in fruit culture, for detection of Agrobacterium tumefaciens, A. vitis, A. rubi, Agrobacterium spp., Brenneria nigrifluens, Erwinia amylovora, Pseudomonas avellanae, Pseudomonas savastanoi pv. savastanoi, Xanthomonas axonopodis pv. citri, Xanthomonas fragariae, Xylella fastidiosa.

Key words: *bacteria, PCR, rt-PCR, sequencing*

Lavori citati

Andy P., Laroche A., Saidon G., Huang H. C., Gilbertson A. R. L. (1994) - Detection of the bean common blight bacteria, *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *X. c.* pv. *phaseoli* var. *fuscans*: Using the polymerase chain reaction. *Phytopathology*, 84, 1185-1192.

Banks D., Albibi R., Chen J., Lamikanra O., Jarret R. L., Smith B. J. (1999) - Specific Detection of *Xylella fastidiosa* Pierce’s Disease Strains. *Current Microbiology*, 39, 85–88.

- Barak J. D., Koike S. T., Gilbertson R. L. (2001) - Role of Crop Debris and Weeds in the Epidemiology of Bacterial Leaf Spot of Lettuce in California. *Plant Disease*, 85, 169-178.
- Bereswill S., Pahl A., Bellemann P., Zeller W., Geider K. (1992) - Sensitive and species-specific detection of *Erwinia amylovora* by polymerase chain reaction analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 3522-3526.
- Berg T., Tesoriero L., Hailstones D. L. (2005) - PCR-based detection of *Xanthomonas campestris* pathovars in *Brassica* seed. *Plant Pathology*, 54, 416-427.
- Bertolini E., Penyalver R., Garcia A., Olmos A., Quesada J.M., Cambra M., Lopez M.M. (2003) - Highly sensitive detection of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in asymptomatic olive plants by nested-PCR in a single closed tube. *Journal Microbiological Methods*, 52, 261-266.
- Cubero J., Graham J. H. (2002) - Genetic relationship among worldwide strains of *Xanthomonas* causing canker in citrus species and design of new primers for their identification by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 1257-1264.
- Darrase A., Priou S., Kotoujansky A., Bertheau Y. (1994) - PCR and restriction fragment length polymorphism of a *pel* gene as a tool to identify *Erwinia carotovora*. *Applied and environmental microbiology*, 60, 1437-1443.
- De Bellis P., Schena L., Cariddi C. (2007) - Real-time Scorpion-PCR detection and quantification of *Erwinia amylovora* on pear leaves and flowers. *European Journal of Plant Pathology*, 118, 11-22.
- Francis M., Lin H., Cabrera-La Rosa J., Doddapaneni H., Civerolo E. L. (2006) - Genome-based PCR primers for specific and sensitive detection and quantification of *Xylella fastidiosa*. *European Journal of Plant Pathology*, 115, 203-213.
- Gervasi F., Scortichini M. (2009) - Detection of *Pseudomonas avellanae* from hazelnut twigs by Taq Man real-time PCR. *Journal of Plant Pathology*, 91, 561-566.
- Haas J. H., Moore L. W., Ream W., Manulis S. (1995) - Universal PCR Primers for Detection of Phytopathogenic *Agrobacterium* Strains. *Applied Environmental Microbiology*, 61, 2879-2884.
- Hartung J. S., Daniel J. F., Pruvost O. P. (1993) - Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* by the polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 1143-1148.
- Higuchi R., Fockler C., Dollinger G., Watson R. (1993) - Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology*, 11, 1026-30.
- Lecomte P., Manceau C., Paulin J. P., Keck M. (1997) - Identification by PCR analysis on plasmid pE29 of isolates of *Erwinia amylovora* responsible of an outbreak in Central Europe. *European Journal of Plant Pathology*, 103, 91-98.
- Leite R. P., Minsavage G. V., Bonas U., Stall R. E. (1994) - Detection and Identification of Phytopathogenic *Xanthomonas* Strains by Amplification of DNA Sequences Related to the *hrp* Genes of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Applied and environmental microbiology*, 60, 1068-1077.
- Llop P., Bonaterra A., Peñalver J., López M. M. (2000) - Development of a highly sensitive nested-PCR procedure using a single closed tube for detection of *Erwinia amylovora* in asymptomatic plant material. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 2071-2078.
- Loreti S., De Simone D., Gallelli A. (2008a) - Detection and identification of *Brenneria nigrifluens*, the causal agent of the shallow bark canker of walnut, by PCR amplification. *Journal of Phytopathology*, 156, 464-469.
- Loreti S., Gallelli A. (2002) - Rapid and specific detection of virulent *Pseudomonas avellanae* strains by PCR amplification. *European Journal of Plant Pathology*, 108, 237-244.
- Loreti S., Gallelli A., Jackson R., Butcher D., Arnold D., Vivian A. (2003) - Characterisation of effector genes in *Pseudomonads* causing disease on hazelnut. In "Pseudomonas syringae and related pathogens" Iacobellis *et al.* eds. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 393-399.
- Loreti S., Gervasi F., Gallelli A., Scortichini M. (2008b) - Further molecular characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *coryli*. *Journal of Plant Pathology*, 90, 57-64.
- Maes M., Garbeva P., Crepel C. (1996) - Identification and sensitive endophytic detection of the fireblight pathogen *Erwinia amylovora* with 235 ribosomal DNA sequences and the polymerase chain reaction. *Plant Pathology*, 45, 1139-1149.
- McManus P. S., Jones A. L. (1995) - Detection of *Erwinia amylovora* by nested PCR and PCR-dot-blot and reverse blot hybridisations. *Phytopathology*, 85, 618-623.
- Minsavage G. V., Thompson C. M., Hopkins D. L., Leite R. M. V. B. C., Stall R. E. (1994) - Development of a polymerase chain reaction protocol for detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue. *Phytopathology*, 84, 456-461.
- Mohammadi M., Moltmann E., Zeller W., Geider K. (2009) - Characterisation of naturally occurring *Erwinia amylovora* strains lacking the common plasmid pEA29 and their detection with real-time PCR. *European Journal Plant Pathology*, 124, 293-302.
- OEPP/EPPO (2004) - *Erwinia amylovora*. In Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 36, 155-158
- OEPP/EPPO (2004) - *Ralstonia solanacearum*. In Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 36, 173-178
- OEPP/EPPO (2006) - *Burkholderia caryophylli*. In Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 36, 95-98
- OEPP/EPPO (2006) - *Clavibacter michiganensis* sp. *sepedonicus*. In Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 36, 99-109
- OEPP/EPPO (2006) - *Pantoea stewartii* sp. *stewartii*. In Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 36, 111-115
- OEPP/EPPO (2006) - *Xanthomonas fragariae*. In Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 36, 135-144
- Penyalver R., Garcia A., Ferrer A., Bertolini E., López M. M. (2000) - Detection of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in olive plants by enrichment and PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 6, 2673-2677.
- Pooler M. R., Hartung J. S. (1995) - Specific PCR detection and identification of *Xylella fastidiosa* strains causing citrus variegated chlorosis. *Current Microbiology*, 31, 377-381.
- Pooler M. R., Ritchie D. F., Hartung J. S. (1996) - Genetic relationships among strains of *Xanthomonas fragariae* based on random amplified polymorphic DNA PCR,

- repetitive intergenic consensus PCR data and generation of multiplexed PCR primers useful for the identification of this phytopathogen. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 3121–3127.
- Pulawska J., Willems A., Sobiczewski P. (2006) - Rapid and specific identification of four *Agrobacterium* species and biovars using multiplex PCR. *Systematic and Applied Microbiology*, 29, 470-479.
- Puopolo A., Raio A., Zoina A. (2007) - Early detection of *Agrobacterium tumefaciens* in symptomless artificially inoculated chrysanthemum and peach plants using PCR. *Journal of Plant Pathology*, 89, 185-190.
- Roberts P. D., Jones J. B., Chandler C. K., Stall R. E., Berger R. D. (1996) - Survival of *Xanthomonas fragariae* on strawberry in summer nurseries in Florida detected by specific primers and nested polymerase chain reaction. *Plant Disease*, 80, 1283-1288.
- Rodrigues L. M., Silva-Stenico M. E., Gomes J. E., Lopes J. R., Tsai S. M. (2003) - Detection and diversity assessment of *Xylella fastidiosa* in field-collected plant and insect samples by using 16S rRNA and *gyrB* sequences. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 4249–4255.
- Salm H., Geider K. (2004) - Real-time PCR for detection and quantification of *Erwinia amylovora*, the causal agent of fireblight. *Plant Pathology*, 53, 602–610.
- Sawada H., Ieki H., Matsuda I. (1995) - PCR detection of Ti and Ri plasmids from phytopathogenic *Agrobacterium strains*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 828–831.
- Schaad N. W., Berthier-Schaad Y., Knorr D. (2007) - A high throughput membrane BIO-PCR technique for ultra-sensitive detection of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Plant Pathology*, 56, 1-8.
- Schaad N. W., Opgenorth D., Gauth P. (2002) - Real-time polymerase chain reaction for one-hour on-site diagnosis of Pierce's Disease of grape in early season asymptomatic vines. *Phytopathology*, 92, 721-728.
- Scottichini M., Marchesi U. (2001) - Sensitive and specific detection of *Pseudomonas avellanae* using primers based on 16S rRNA gene sequences. *Journal of Phytopathology*, 149, 527-532.
- Segonds C., Heulin T., Marty N., Chabanon G. (1999) - Differentiation of *Burkholderia* Species by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of the 16S rRNA Gene and Application to Cystic Fibrosis Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 37, 2201–2208.
- Smid E. J., Jansen A. H. J., Gorris G. M. (1995) - Detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and *Erwinia chrysanthemi* in potato tubers using polymerase chain reaction. *Plant Pathology*, 44, 1058-1069.
- Su C. C., Yang W. J., Hsu S. T., Tzeng K. C. (2008) - Specific detection of *Xylella fastidiosa* strains causing pear leaf scorch by polymerase chain reaction. *Plant Pathology Bulletin*, 17, 183-194.
- Suzaki K., Yoshida K., Sawada H. (2004) - Detection of tumorigenic *Agrobacterium* strains from infected apple saplings by colony PCR with improved PCR primers. *Journal of General Plant Pathology*, 70, 342–347
- Takle G. W., Toth I. K., Brurberg M. B. (2007) - Evaluation of reference genes for real-time RT-PCR expression studies in the plant pathogen *Pectobacterium atrosepticum*. *Plant Biology*, 7, 1471-2229.
- Turechek W.W., Hartung J.S., McCallister J. (2008) - Development and optimization of a real-time detection assay for *Xanthomonas fragariae* in strawberry crown tissue with receiver operating characteristic curve analysis. *Phytopathology*, 98, 359-368.
- Vandroemme J., Baeyen S., Van Vaerenbergh J., De Vos P., Maes M. (2008) - Sensitive real-time PCR detection of *Xanthomonas fragariae* in strawberry plants. *Plant Pathology*, 57, 438–444.
- Vieira J., Mendes M. V., Albuquerque P., Moradas-Ferreira P., Tavares F. (2007) - A novel approach for the identification of bacterial taxa-specific molecular markers. *Letters in Applied Microbiology*, 44, 506–512
- Weller S. A., Beresford-Jones N. J., Hall J., Thwaites R., Parkinson N., Elphinstone J. G. (2007) - Detection of *Xanthomonas fragariae* and presumptive detection of *Xanthomonas arboricola* pv. *fragariae*, from strawberry leaves, by real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods*, 70, 379–83.
- Yan S., Liu H., Mohr T. J., Jenrette J., Chiodini R., Zaccardelli M., Setubal J. C., Vinatzer B. A. (2008) - Role of Recombination in the Evolution of The Model Plant Pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, a Very Atypical Tomato Strain. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 3171-3181.
- Zaccardelli M., Spasiano A., Bazzi C., Merighi M. (2005) - Identification and in planta detection of *pseudomonas syringae* pv *tomato* using PCR amplification of *hrpZ_{pst}*. *European journal of Plant Pathology*, 111, 85-90
- Zaccardelli M., Campanile F., Spasiano A., Merighi M. (2007) - Detection and identification of the crucifer pathogen, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, by PCR amplification of the conserved Hrp/type III secretion system gene *hrcC*. *European Journal of Plant Pathology*, 118, 299-306.
- Zaccardelli M., Campanile F., Vinatzer B. A., Greenberg J. T. (2005) - Diffusion of avirulence genes *avrPto* and *avrRpt2* in populations of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Journal of Plant Pathology*, 87, S4, 238.
- Zaccardelli M., F Campanile., Yan S., Vinatzer Boris A. (2007) - Frequences and evolution of effector genes in strains of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Journal of Plant Pathology*, 89, s3,24.
- Zimmermann C., Hinrichs-Berger J., Moltmann E., Buchenauer H. (2004) - Nested PCR (polymerase chain reaction) for detection of *Xanthomonas fragariae* in symptomless strawberry plants. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz, Journal of Plant Disease and Protection*, 111, 39–51.