

## INDIVIDUAZIONE E CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI MICOPLASMI PRESENTI IN COLTIVAZIONI DI PERO DELL'EMILIA-ROMAGNA.

ASSUNTA BERTACCINI, MONICA VIBIO, G. DE LUCA, A. VILLANI  
Istituto di Patologia Vegetale, Università degli Studi, Bologna

Fra le malattie che colpiscono la coltura del pero la moria è una delle più gravi: essa è associata alla presenza di micoplasmi in grado di sopravvivere durante l'inverno nell'apparato radicale e di ricolonizzare la parte aerea della pianta a primavera. Presente da molti anni in Italia, la malattia è stata segnalata anche in altri paesi europei se pur con un'incidenza limitata. Una diagnosi tempestiva e certa è alla base ogni intervento di lotta per la sua eradicazione dalle aree frutticole interessate. In questo studio sono state impiegate tecniche di biologia molecolare allo scopo di individuare e caratterizzare i micoplasmi presenti in un frutteto dell'Emilia-Romagna.

E' stato preso in esame un pereto di tre anni in cui nel giugno 1992 il 40% delle piante di "William" innestate su cotogno Sydo presentava evidenti sintomi di arrossamento ed arrotolamento fogliare. Quattro di queste piante sono state incappucciate con reti a prova di insetto e poste a contatto con piante sane di vinca mediante ponte di cuscuta. Altre 30 piante di vinca sono state poste in pieno campo per verificare la presenza di micoplasmi. Tra le altre piante sintomatiche di pero ne sono state scelte 14 da cui sono stati prelevati campioni di foglie, rametti, giovani germogli, porzioni di tessuto vascolare per l'esame di laboratorio.

Per ogni campione di pero e di vinca il DNA è stato estratto da 2 g di materiale ed amplificato mediante PCR impiegando oligonucleotidi che amplificano una sequenza 16S rDNA dei micoplasmi. Dopo l'amplificazione aliquote di 20 µl di ogni campione amplificato sono state sottoposte all'analisi del polimorfismo della lunghezza dei frammenti di restrizione (RFLP).

Sono stati ottenuti prodotti di amplificazione della lunghezza attesa di 1.200 basi da 6 campioni di pero (TABELLA 1): in particolare una sola delle piante incappucciate è risultata positiva all'indagine molecolare e nessuna delle vinche ad esse unite dal ponte di cuscuta è risultata positiva. Per quanto riguarda le piante di vinca esposte in campo, risultati positivi si sono ottenuti da 9 degli 11 campioni sintomatici. I campioni di controllo contenenti DNA estratto da piante sane o privi di acido nucleico sono risultati negativi.

L'esame dei profili elettroforetici dopo RFLP dei prodotti di amplificazione genica dei campioni di pero risultati positivi, ha permesso di evidenziare la formazione di bande di diversa lunghezza. Il confronto delle bande ottenute dalla digestione della porzione di DNA ribosomiale amplificata dai peri con quelle ottenute da campioni infetti impiegati come controllo, ha permesso di verificare che i micoplasmi presenti nei peri hanno profili di restrizione fra loro identici e simili a quelli inseriti nel gruppo 16SrX. Si è riscontrata concordanza di risultati usando i due enzimi di restrizione,

AluI ed RsaI. Questo esame condotto sui campioni di vinca positivi in PCR (TABELLA 1) ha portato all'ottenimento di profili di restrizione uguali per tutti i campioni di vinca considerati e con entrambi gli enzimi impiegati. I profili ottenuti dai campioni di vinca sono risultati riferibili al gruppo 16SrI, diversi quindi dai profili ottenuti dagli amplificati dai peri oggetto di questa indagine.

TABELLA 1 - Schema riassuntivo dei risultati ottenuti mediante indagine molecolare (PCR) sui campioni di pero e di vinca in campo\*.

Piante di pero	Risultati di PCR	Presenza di sintomi caratteristici	
		1992	1993
29A	+	si	no
30A	+	si	si
33A	-	si	si
36A	+	si	no
77A	-	si	no
80A	-	no	si
91A	-	si	si
96A	-	si	si
7B	-	no	no
15B	-	si	no
26B	+	no	si
5C	+	si	no
38D	-	no	no
13E	+	si	no

+, presenza della banda specifica in gel di agarosio (15 µl di prodotto di PCR); -, assenza di banda.

\*, Sono evidenziate con il grassetto le piante che sono state isolate con rete e utilizzate per i tentativi di trasmissione con cuscuto.

I risultati ottenuti confermano che l'esame del solo quadro sintomatologico non è sufficiente per l'individuazione della presenza dei micoplasmi: non solo il sintomo dell'arrossamento non è costante nel tempo, ma non tutte le piante che presentavano tale sintomo hanno portato ad ottenere amplificazione di frammenti di DNA di micoplasmi. Il ritrovamento di tali frammenti nel 36% delle vinche esposte in campo ha messo in evidenza la presenza di un'infezione nel campo, veicolata verosimilmente da vettori animali, apparentemente associata ad un micoplasma differente da quelli presenti nei peri. A questo riguardo si possono avanzare diverse ipotesi: può esserci stata una infezione indipendente in vinca, grazie ad un vettore non individuato, oppure si può essere in presenza di una doppia infezione in pero non evidenziata con le tecniche impiegate. Questa ipotesi comporta un'azione di "filtro" esercitata dall'ipotetico vettore nel trasmettere il patogeno alla vinca. Ulteriori ricerche ed affinamenti della tecnica impiegata potranno chiarire il ruolo che la presenza di micoplasmi geneticamente differenti nell'ambiente pereto possono giocare nella comparsa e nel mantenimento della moria in parecchie aree frutticole d'Italia.