

TIPIZZAZIONE MOLECOLARE DI CEPPI DI *ERWINIA AMYLOVORA* MEDIANTE ANALISI PFGE

C. BAZZI*, S. JOCK**, W.-S. KIM**, M.M. LÓPEZ***, K. GEIDER**

(*) U.C.I. "S.T.A.A."/Istituto di Patologia Vegetale, Università degli Studi, Via F. Re, 8
40126 Bologna, Italia

(**) Max-Planck-Institut für Zellbiologie, Rosenhof, D-68526 Ladenburg, Germania

(***) Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Carretera Moncada a Naquera Km 4,5,
Sp-46113 Moncada/Valencia, Spagna

RIASSUNTO

Ceppi di *Erwinia amylovora*, isolati in tempi diversi ed in diverse aree di Emilia-Romagna, Veneto e Lombardia, sono stati saggiati mediante analisi PFGE del DNA genomico dopo digestione con *Xba*I. I loro profili sono stati confrontati con quelli di ceppi dalla Spagna, Francia, Belgio, Olanda, Inghilterra, Germania, Polonia, Bulgaria ed Egitto. La maggior parte dei ceppi isolati in Pianura Padana hanno mostrato profili simili, raggruppati nel tipo Pt3. Tale profilo è stato confermato per un ceppo isolato da sorbo nel 1999 in provincia di Bolzano, per i ceppi dalla Spagna centrale, Francia settentrionale, il maggior numero dei ceppi dal Belgio ed un ceppo dall'Olanda. Tre ceppi, di cui due isolati nel 1991 ed uno nel 1992 da biancospini in provincia di Ravenna, hanno generato un nuovo profilo (Pt6), diverso da quelli precedentemente trovati in Italia. Quattro ceppi dalla Polonia hanno confermato la distribuzione di Pt1 come profilo costante osservato nella Francia orientale e nell'Europa centrale, condiviso da due ceppi isolati nel 1999 da peri e meli in Alto Adige. I due profili Pt1 e Pt4 sono stati rilevati in ceppi dall'Inghilterra meridionale ed il secondo tipo ha caratterizzato ceppi dalla Francia occidentale e Spagna nord-orientale. La differenziazione dei ceppi di *E. amylovora* saggiati con PFGE potrebbe fornire ulteriori elementi per formulare ipotesi su origine e diffusione del patogeno e del colpo di fuoco in diverse aree frutticole d'Europa.

Parole chiave: *Erwinia amylovora*, tipizzazione molecolare, PFGE, colpo di fuoco, diffusione.

SUMMARY

MOLECULAR TYPING OF *ERWINIA AMYLOVORA* STRAINS BY PFGE ANALYSIS

Erwinia amylovora strains, isolated at different times in different areas of northeastern Italy (Emilia-Romagna, Veneto and Lombardia regions), were assayed by PFGE analysis of genomic DNA after an *Xba*I digestion. Their patterns were compared to those of strains from Spain, France, Belgium, the Netherlands, England, Germany, Poland, Bulgaria and Egypt. The majority of strains from the Po River Valley showed similar patterns and grouped into type Pt3. This was confirmed for strains from central Spain, northern France, most strains from Belgium and one strain from the Netherlands. Interestingly, three strains, two of which isolated in 1991 and one in 1992 from hawthorn in the district of Ravenna showed a novel pattern (Pt6), different from those previously found in Italy. Four strains from Poland confirmed the distribution of Pt1, as a constant pattern observed in eastern France and central Europe, shared with two strains isolated in 1999 from pear and apple trees in Southern Tyrol. The two patterns Pt1 and Pt4 were recovered in strains from southern England, and the latter type characterized strains from western France and northeastern Spain. Differentiation of *E. amylovora* strains assayed by PFGE could possibly give additional clues about the origin and spread of the pathogen and fire blight in different fruit-growing areas of Europe.

Key words: *Erwinia amylovora*, molecular typing, PFGE, fire blight, spread.

INTRODUZIONE

La diffusione del colpo di fuoco batterico delle rosacee in Europa, nei Balcani e nell'area della regione Mediterranea orientale appare inarrestabile; tra gli Stati della Ue, solo il Portogallo ne è tuttora esente (EPPO/CABI, 1997). In particolare, pur essendo stata la gravità della malattia assai più bassa nel 1999 (674 focolai) che nel 1997 e 1998 (rispettivamente 721 e 1333 focolai), la situazione nella regione Emilia-Romagna rimane preoccupante anche per la progressiva espansione dell'area di presenza della malattia nelle province di Forlì/Ravenna (verso est) e di Reggio Emilia/Piacenza (verso ovest) (dati del Servizio Fitosanitario Regionale, Bologna). Un nuovo grido di allarme giunge altresì dall'Alto Adige dove, durante la estate 1999, sono stati diagnosticati alcuni casi su pero e melo (Anonimo, 1999). Precedenti studi, basati sulla analisi genomica di ceppi di *E. amylovora* mediante gel elettroforesi in campo pulsato (PFGE), hanno permesso di formulare ipotesi sulla disseminazione a grande distanza di popolazioni del patogeno di diversa origine (Zhang e Geider, 1997; Zhang *et al.*, 1998; Bazzi *et al.*, 1999). Gli scoppi epidemici ed i casi di malattia in Italia e Spagna hanno rinnovato la domanda riguardante la possibile relazione tra i ceppi batterici isolati in queste aree e quelli da altre parti dell'Europa. Principale scopo di questo lavoro è stato quello di estendere l'analisi genomica ad altri ceppi di *E. amylovora* per migliorare le conoscenze sulla distribuzione territoriale di gruppi omogenei, caratterizzati da diversi profili PFGE.

MATERIALI E METODI

Sono stati analizzati 75 ceppi di *E. amylovora*, isolati in diversi anni, da varie specie ospiti e di diversa origine geografica: Italia (Pianura Padana, 21; Alto Adige, 3), Spagna (14), Francia (18), Belgio (8), Olanda (1), Inghilterra (4), Germania (2) e Polonia (4); ceppi di origine inglese (2), egiziana (1), francese (1) e bulgara (1), già definiti rispettivamente per i profili standard Pt1/Pt4, Pt2, Pt3 e Pt5 (Bazzi *et al.*, 1999) sono stati usati come controllo. Per allevare i batteri, preparare i campioni di DNA genomico digerito con gli enzimi di macrorestrizione *XbaI* e *SpeI* e per le analisi PFGE sono stati usati i protocolli di Zhang e Geider (1997).

RISULTATI

La maggior parte dei ceppi di *E. amylovora* isolati in Pianura Padana ha mostrato profili simili, di tipo Pt3. Tale profilo è stato confermato per 1 isolato da sorbo in Alto Adige, per 4 ceppi dalla Spagna centrale, 3 dalla Francia settentrionale, 6 dal Belgio ed 1 dall'Olanda (isolato da *Salix* sp.). Solo 3 ceppi, due dei quali isolati nel 1991 ed uno nel 1992 da sorbi e biancospini in provincia di Ravenna, sono stati caratterizzati da un nuovo profilo denominato Pt6 (Fig. 1). Due ceppi dall'Alto Adige, 4 dalla Polonia, 2 dal Belgio e 3 dall'Inghilterra meridionale sono stati raggruppati nel tipo Pt1, profilo osservato nei ceppi provenienti da Francia orientale (5) e Germania (2). Nel profilo di tipo Pt4 sono stati raggruppati 21 ceppi, isolati nella Francia occidentale (10), nella Spagna nord-orientale (10) e nell'Inghilterra meridionale (1). Tutti i profili sono risultati diversi da quelli dei ceppi dall'Egitto e dalla Bulgaria, usati rispettivamente come standard per i tipi Pt2 e Pt5. Inoltre, i ceppi con profilo Pt3 hanno generato un tipico profilo *SpeI*, con un frammento dominante di 800 kb.

CONCLUSIONI

Le differenze tra i profili PFGE dei ceppi di *E. amylovora* isolati in Europa, apparentemente dovute a piccole variazioni genotipiche spontanee, potrebbero essere messe in relazione con

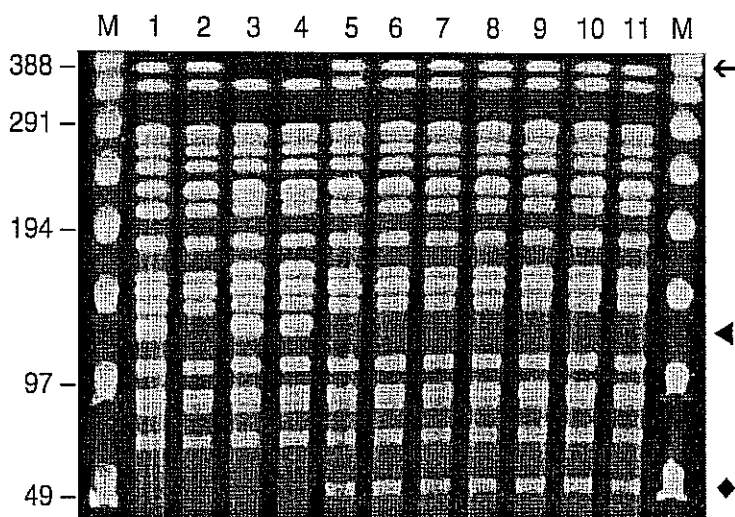


Figura 1 – Profili PFGE dopo digestione con *Xba*I del DNA genomico di ceppi di *E. amylovora* isolati in Emilia Romagna. I profili (Pt6) dei due ceppi isolati nel 1991 in provincia di Ravenna (corsie 3, 4) hanno generato la banda di 130 kb ma non quella di circa 388 kb (←), evidente nel profilo Pt1 del ceppo standard isolato in Germania (corsia 1). I profili Pt3 degli altri ceppi (corsie 5-11) e del ceppo standard isolato nella Francia settentrionale (corsia 2) non mostrano la tipica banda di 130 kb (→); si noti la presenza di una banda aggiuntiva di circa 50 kb (♦) presente nei profili Pt3 (corsie 5-11), ma assente nel profilo del ceppo di controllo (corsia 2). M = marcatore di multimeri λ .

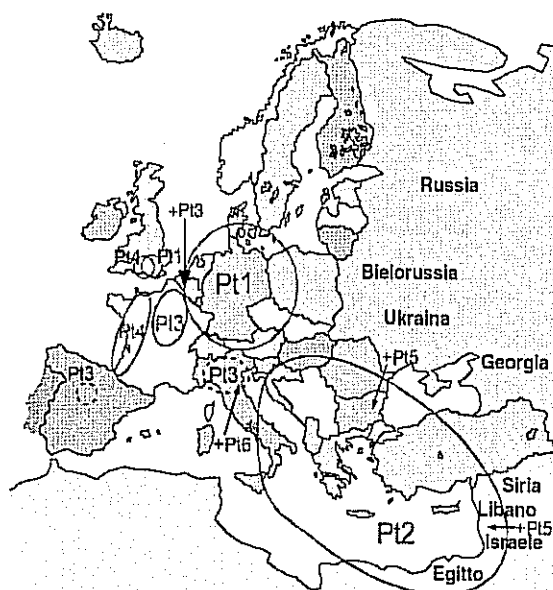


Figura 2 – Mappa della distribuzione territoriale delle popolazioni di *E. amylovora* disegnata a seguito della tipizzazione molecolare mediante PFGE. In Italia sono stati sino ad ora differenziati i profili Pt1 (*), Pt2, Pt3 e Pt6 (→).

la loro origine geografica. I profili genomici sono risultati marcatamente stabili in vasti areali di isolamento, nonché dopo numerosi trasferimenti su substrato nutritivo in laboratorio: i polimorfismi della lunghezza dei frammenti di restrizione (RFLP) hanno riguardato per lo più un singolo frammento di DNA tra i molti frammenti comuni. La tipizzazione dei ceppi batterici saggiati, pur confermando in gran parte i risultati precedentemente ottenuti (Zhang *et al.*, 1998; Bazzi *et al.*, 1999), ha messo in luce alcune interessanti novità. Tra queste: i) la condivisione del profilo Pt3, prevalente non solo tra i ceppi isolati in Pianura Padana, nella Francia settentrionale e nella Spagna centrale, ma anche tra la maggior parte dei ceppi analizzati di origine belga; ii) l'esistenza di un profilo (Pt6) mai osservato prima, mostrato da ceppi isolati nel 1991 e nel 1992 da sorbi e biancospini importati dall'Olanda (in realtà, non è mai esistito alcun documento ufficiale attestante l'origine del materiale vegetale) e trapiantati in vivaio in provincia di Ravenna. Durante l'estate 1991, ispezioni del Servizio Fitosanitario Regionale (ex OMP-BO) portarono, tuttavia, alla intercettazione delle piante infette, prontamente distrutte (Curto, 1992; Bazzi, 1992). L'analisi genomica dei ceppi dall'Olanda e da altri Stati europei non ha sino ad ora messo in evidenza profilo Pt6 e ciò stimola la prosecuzione delle indagini su altri ceppi batterici di varia provenienza ottenuti negli ultimi dieci anni. La differenziazione dei ceppi di *E. amylovora* offre la possibilità di formulare ipotesi sulle vie di diffusione del colpo di fuoco indicate dai vari "tipi molecolari" (Fig. 2): dall'Inghilterra meridionale all'Europa centrale (attraverso l'Olanda; vedi profilo Pt1 di altri ceppi di origine olandese saggiati da Zhang e Geider, 1997), Francia orientale (Pt1) e Francia occidentale (Pt4); dalla Francia occidentale alla Spagna nord-orientale (Pt4); dal Belgio/Francia settentrionale alla Pianura Padana (Pt3); dall'Egitto alla regione Mediterranea-orientale ed ai Balcani (Pt2). In particolare, i profili Pt1 e Pt3 dei ceppi dall'Alto Adige potrebbero giustificare una disseminazione di *E. amylovora* rispettivamente dall'Austria e dalla Pianura Padana mediante vettori biotici (insetti, uccelli) e/o abiotici (trasporto aereo di aerosol solidi). Il profilo Pt3, prevalente nelle popolazioni del batterio in Pianura Padana e nella Spagna settentrionale potrebbe invece sostenere l'ipotesi di una introduzione del patogeno per mezzo di materiali di propagazione infetti asintomatici. Da dove? La complessità dei movimenti internazionali dei materiali vegetali è ben nota ed alla luce dei risultati ottenuti, la risposta richiede prudenza ed ulteriori evidenze.

LAVORI CITATI

- ANONIMO, 1999. Il colpo di fuoco ha raggiunto l'Alto Adige. *Südtiroler Beratungsring für Obst-und Weinbau*, 23, N. 147, 16/07/1999.
- BAZZI C., MERIGHI M., LOPEZ M.M., ZHANG Y., JOCK S., GEIDER K., 1999. Differentiation of *Erwinia amylovora* strains isolated in southern Europe by PFGE analysis. *Acta Horticulturae*, 489, 197-200.
- BAZZI C., 1992. Present status and new occurrences of fire blight: Italy. In: *Fire Blight Newsletter* (van der Zwet T., ed.). United States Department of Agriculture, Kearneysville, 9.
- CURTO M.G., 1992. Bilancio delle avversità in Emilia Romagna. *Terra e Vita*, 33, 45-47.
- CABI/EPPO, 1997. Data sheets on quarantine pests: *Erwinia amylovora*. In: *Quarantine pests for Europe. Bacteria* (Smith I.M., McNamara D.G., Scott P.R., Holderness M., Burger B., ed.). CAB International, Wallingford, 1001-1007.
- ZHANG Y., GEIDER K., 1997. Differentiation of *Erwinia amylovora* strains by pulsed-field gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 4421-4426.
- ZHANG Y., MERIGHI M., BAZZI C., GEIDER K., 1998. Genomic analysis by pulsed-field gel electrophoresis of *Erwinia amylovora* strains from the Mediterranean region including Italy. *Journal of Plant Pathology*, 80, 225-232.