

STUDI PRELIMINARI SUGLI SCOPAZZI DELL'EUCALIPTO E DEL MIRTO IN ITALIA MERIDIONALE

I. CAMELE¹, M. VIBIO², G. L. RANA¹, A. BERTACCINI¹

¹ Dipartimento di Biologia, Difesa e Biotecnologie Agro-Forestali, Università degli Studi della Basilicata, via N. Sauro 85 - 85100, Potenza

² Istituto di Patologia Vegetale, Università degli Studi di Bologna, via F. Re 8 - 40126, Bologna

Riassunto

Viene segnalata la presenza di fitoplasmi in piante di eucalipto e di mirto localizzate in diverse zone dell'Italia meridionale ed interessate da giallume, scopazzi e disseccamento più o meno accentuato della chioma. L'individuazione di detti procarioti, presenti esclusivamente nelle piante sintomatiche, è avvenuta mediante "nested"-PCR (amplificazione genica) con due coppie di oligonucleotidi che amplificano porzioni altamente conservate del gene che codifica per l'rRNA ribosomiale 16S dei fitoplasmi. Sono stati controllati 30 campioni e quasi tutti quelli di mirto e due di eucalipto sono risultati infetti. Nessuna amplificazione è stata ottenuta dai campioni di mirto ed eucalipto asintomatici o dai campioni di controllo negativi.

Parole chiave: fitoplasmi, eucalipto, mirto, amplificazione genica.

Summary

PRELIMINARY STUDIES ON EUCALYPTUS AND MYRTLE WITCHES' BROOM IN SOUTHERN ITALY

The presence of phytoplasmas has been detected in eucalyptus and myrtle plants growing in Southern Italy. The infected plants showed yellowing, witches' broom, diffused or asymmetric yellowing of the crown. Phytoplasma detection was performed by nested-PCR (polymerase chain reaction) with the use of two sets of primer pairs amplifying respectively 1.3 and a 1.2 kb DNA fragments in the highly conserved region of phytoplasmas 16S rRNA. Among 30 plants tested most of the symptomatic myrtle and only a few eucalyptus samples were positive and showed the presence of the specific phytoplasma DNA bands after amplification. No amplification was detected in the asymptomatic eucalyptus and myrtle samples and in the negative controls.

Key words: phytoplasmas, eucalyptus, myrtle, polymerase chain reaction.

INTRODUZIONE

Negli ultimi anni sono state osservate alterazioni di probabile origine fitoplasmatica in piante di eucalipto (*Eucalyptus* spp.) e mirto (*Myrtus communis* L.) in Puglia, Molise e Basilicata. Gli alberi di eucalipto sintomatici sono stati notati principalmente fra quelli formanti le barriere frangivento che costeggiano l'autostrada del sole nei tratti Bari-Pescara e Bari-Napoli, fra quelli ai bordi di alcune strade provinciali e nelle alberature cittadine di alcuni centri pugliesi (Tabella 1). I sintomi consistono in accentuata clorosi, riduzione delle dimensioni del lembo fogliare e scopazzi; frequentemente sono presenti anche arrotolamento fogliare, proliferazione dei germogli laterali lungo il tronco e disseccamenti della vegetazione che interessano, a volte in maniera asimmetrica, alcune branche apicali o, nei casi più gravi, gran parte della chioma. Durante la fioritura sono presenti sovente anche piccoli scopazzi che sostituiscono le infiorescenze. Se le piante colpite sono giovani sono presenti disseccamenti quasi completi a livello della chioma con emissione di ricacci scopazzati e clorotici lungo il tronco. Le piante di mirto sintomatiche, rinvenute in alcuni giardini della città di Bari, presentano fenomeni di clorosi generalizzata, notevole riduzione del lembo fogliare, cespugliamento, scopazzatura e fasciatura su parecchi rami. I sintomi riscontrati su eucalipto sono simili a quelli già descritti in altri Paesi su varie specie di questa mirtacea (vedi fra gli altri Maramorosch, 1983; Bos *et al.*, 1990; Kyriakopoulou *et al.*, 1992) ed a volte

attribuiti ad infezioni fitoplasmatiche in base ad osservazioni al microscopio elettronico, mentre quelli osservati su mirto non sembrano essere stati prima d'ora segnalati altrove.

Al fine di verificare la presenza di fitoplasmismi nelle suddette piante sono state effettuate indagini di laboratorio impiegando tecniche sensibili di biologia molecolare basate sull'amplificazione genica. I risultati ottenuti formano l'oggetto della presente nota.

MATERIALI E METODI

Nella tarda primavera ed estate 1994 e 1995, sono stati prelevati 30 campioni sintomatici ed alcuni asintomatici di mirto ed eucalipto rispettivamente da alcuni giardini baresi e da alcune aree dell'Italia meridionale (Tabella 1). Dagli stessi si è proceduto ad estrarre l'acido nucleico per poi effettuare esperimenti di amplificazione genica ("polymerase chain reaction", PCR).

Per l'estrazione degli acidi nucleici si sono impiegati per ogni campione 2 g di nervature fogliari procedendo poi secondo il metodo descritto da Lee *et al.*, 1991. Come controllo positivo per le reazioni di amplificazione genica sono stati utilizzati campioni di acido nucleico ottenuti da piante di vinca infette da fitoplasmismi appartenenti ad alcuni dei ceppi tipo già parzialmente caratterizzati a livello molecolare ed in particolare, AY ("Maryland aster yellows") (Lee *et al.*, 1992; 1993), IPVR ("Italian periwinkle virescence") (Vibio *et al.*, 1996), CX ("Peach X disease") (Lee *et al.*, 1993), EY ("Elm yellows") (Lee *et al.*, 1993) ed AP ("Apple proliferation") (Lee *et al.*, 1995). Come campioni di controllo negativi sono stati impiegati, oltre agli acidi nucleici estratti da campioni asintomatici di mirto ed eucalipto, quelli estratti da vinca sana ed altri in cui l'acido nucleico era stato sostituito da acqua sterile.

Per gli esperimenti di PCR sono stati impiegati oligonucleotidi che amplificano porzioni altamente conservate dell'acido nucleico ribosomiale nella sua componente 16S (Lee *et al.*, 1993; Schneider *et al.*, 1993; Namba *et al.*, 1993). In particolare, è stata effettuata una prima amplificazione diretta impiegando gli oligonucleotidi R16F1/R0 (Lee *et al.*, 1995), che amplificano un frammento di circa 1300 nucleotidi. I prodotti della prima amplificazione diluiti 1 a 50 sono stati sottoposti ad una seconda amplificazione ("nested"-PCR) con gli oligonucleotidi R16F2/R2 (Lee *et al.*, 1993) che amplificano un frammento di circa 1200 nucleotidi. L'acido nucleico estratto dalle piante da saggiare è stato portato ad una concentrazione di 20 ng/ μ l nella miscela di reazione descritta da Schaff *et al.* (1992) e sono stati effettuati sia per l'amplificazione diretta che per quella "nested" 35 cicli di amplificazione. Ogni ciclo ha previsto 1 minuto di denaturazione a 94°C, 2 minuti a 50°C per permettere l'appaiamento delle basi complementari e 3 minuti a 72°C per consentire l'allungamento delle sequenze amplificate da un estremo all'altro della regione compresa tra gli oligonucleotidi impiegati. Durante l'ultimo ciclo questa fase è stata protratta per 10 minuti.

Aliquote di 7 μ l dei prodotti ottenuti dopo PCR sono state sottoposte ad elettroforesi orizzontale in gel di agarosio all'1% in tampone TA (Sambrook *et al.*, 1989). La visualizzazione dell'avvenuta reazione è stata eseguita con colorazione al bromuro di etidio in acqua, seguita da osservazione agli ultravioletti mediante transilluminatore ad una lunghezza d'onda di 312 nm e foto con apparecchio Polaroid.

RISULTATI

L'impiego della coppia di oligonucleotidi R16F1/R0 in reazioni di amplificazione diretta non ha dato luogo a prodotti amplificati visibili nel gel di agarosio da nessuno dei campioni di eucalipto e mirto esaminati e dai controlli di piante asintomatiche mentre il frammento della lunghezza attesa è stato evidenziato nei controlli positivi. I successivi esperimenti di

"nested"-PCR con gli oligonucleotidi R16F2/R2 hanno permesso di ottenere bande di DNA visibili in agar, non solo dai campioni di controllo positivo, ma anche da alcuni dei campioni sintomatici di eucalipto e da molti dei campioni sintomatici di mirto (Tabella 1). Nessun amplificato è stato ottenuto dai campioni asintomatici di eucalipto e mirto, dal campione di vinca sana e dalla miscela di reazione in cui non era presente acido nucleico (Fig. 1).

Tabella 1. Risultati degli esperimenti di "nested"-PCR effettuati sui campioni di mirto ed eucalipto presentanti sintomi di giallume e scopazzi.

Eucalipto			Mirto		
Luogo di raccolta	N. campione	Risultato	Luogo di raccolta	N. campione	Risultato
autostrada Bari-Napoli	1	-	scuola Miralta Bari	1	+++
autostrada Bari-Napoli	2	-	scuola Miralta Bari	2	-
autostrada Bari-Napoli	3	+	scuola Miralta Bari	3	+++
autostrada Bari-Napoli	4	++	scuola Miralta Bari	4	-
zona industriale Bari	1	-	scuola Miralta Bari	5	+++
zona industriale Bari	2	-	scuola Miralta Bari	6	++
zona industriale Bari	3	-	scuola Miralta Bari	7	+
zona industriale Bari	4	-	scuola Miralta Bari	8	+
zona industriale Bari	5	-	Facoltà di Agraria Bari	1	-
zona industriale Bari	6	-	Facoltà di Agraria Bari	2	++
zona industriale Bari	7	-			
zona industriale Bari	8	-			
palestra Molfetta	1	-			
palestra Molfetta	2	-			
palestra Molfetta	3	-			
palestra Molfetta	4	-			
palestra Molfetta	5	-			
palestra Molfetta	6	-			
palestra Molfetta	7	-			
palestra Molfetta	8	-			

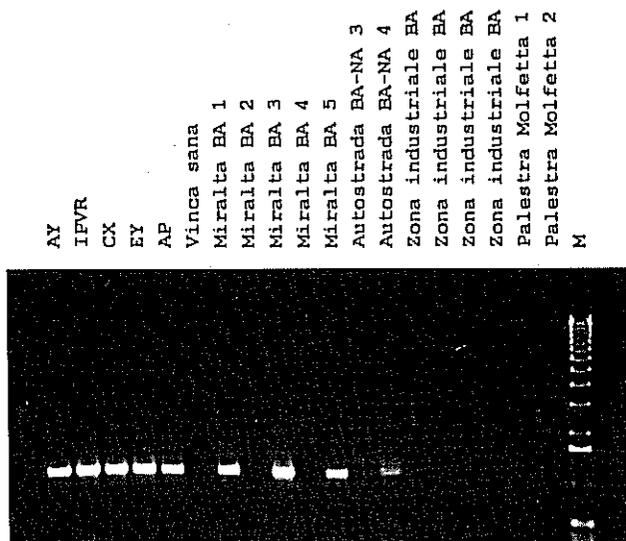
-, nessuna banda visibile in gel di agarosio; +, banda di 1200 nucleotidi debolmente visibile in gel di agarosio; ++, banda di 1200 nucleotidi visibile in gel di agarosio; +++, banda di 1200 nucleotidi chiaramente visibile in gel di agarosio.

CONCLUSIONI

L'impiego di oligonucleotidi che amplificano sequenze di DNA altamente conservate (Lee *et al.*, 1993; Namba *et al.*, 1993; Schneider *et al.*, 1993) ha permesso di individuare la presenza di DNA di fitoplasmii, la cui identificazione è in corso, in alcuni dei campioni di eucalipto e nella maggior parte dei campioni di mirto sintomatici esaminati. E' questa la prima conferma della presenza di fitoplasmii in mirtacee effettuata mediante amplificazione genica. I risultati negativi ottenuti per l'eucalipto sono spiegabili considerando sia la maniera non omogenea di distribuzione di detti procarioti nelle piante arboree e l'esigua consistenza del campione esaminato (2 g) per ogni pianta, sia il fatto che la concentrazione dei fitoplasmii nelle piante arboree e/od arbustive infette non è generalmente correlata con l'intensità dei sintomi. Pur essendo già state riportate in Italia meridionale numerose infezioni di probabile natura fitoplasmatica su molte piante coltivate e spontanee (Ragozzino *et al.*, 1977), questa

Didascalia della fotografia

Fig. 1. Fotografia agli ultravioletti di un gel di agarosio all'1% in cui sono stati depositati i prodotti di "nested"-PCR ottenuti da alcuni dei campioni di eucalipto e mirto esaminati. I "primers" impiegati sono stati R16F2/R2 e le bande di DNA ottenute sono di circa 1200 nucleotidi. M, marker rappresentato dall' 1kb DNA ladder (lunghezza dei frammenti in nucleotidi, dall'alto al basso: 12.2, 11.1, 10.1, 9.1, 8.1, 7.1, 6.1, 5.0, 4.0, 3.0, 2.0, 1.6, 1.0, 0.5, 0.3, 0.2, e 0.1). Campioni: AY; "aster yellows"; IPVR, "Italian periwinkle virescence"; CX; "peach X disease"; EY, "elm yellows"; AP, "apple proliferation"; le altre abbreviazioni sono come da Tabella 1.



sembra essere, tuttavia, la prima segnalazione della presenza di fitoplasmi in due mirtacee nel nostro Paese e la prima nel mondo su mirto. Ulteriori indagini molecolari permetteranno di identificare i fitoplasmi individuati verificando, inoltre, se siano identici o differenti dal punto di vista filogenetico.

Lavoro svolto con un contributo del Ministero dell'Università e della Ricerca scientifica e tecnologica (MURST 40%: "Epidemiologia, diagnosi e terapia delle malattie delle piante causate da virus, viroidi e micoplasmi").

LAVORI CITATI

- BOS L., MAKKOUK K.M., BAYAA B. (1990). Witches' broom and decline of *Eucalyptus*, serious disease in Syria likely caused by mycoplasma. *Arab Journal of Plant Protection*, 8(2), 135-143.
- KIRIAKOPOULOU P.E., PANAGOPULOS C.G., BAYAA B.O. (1992). *Eucalyptus* in Greece. The tree is threatened by a serious infectious disease. *Georgia Ktinotrophia*, 3(5), 18-24.
- LEE I.-M., DAVIS R.E., HIRUKI C. (1991). Genetic relatedness among clover proliferation mycoplasma-like organisms (MLOs) and other MLOs investigated by nucleic acid hybridization and restriction fragment length polymorphism analyses. *Applied Environmental Microbiology*, 57, 3565-3569.
- LEE I.-M., HAMMOND R.W., DAVIS R.E., GUNDERSEN D.E. (1993). Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organism. *Phytopathology*, 83, 834-842.
- LEE I.-M., BERTACCINI A., VIBIO M., GUNDERSEN D. E. (1995). Detection of multiple phytoplasmas in perennial fruit trees with decline symptoms in Italy. *Phytopathology*, 85, 728-735.
- MARAMOROSCH K., SHIKATA E., ZHI-YAN LI. (1982). Little leaf of *Eucalyptus tereticornis* in India associated with mycoplasmas. *V IUFRO W.P. Conference Mycoplasma Diseases, University Wisconsin, Green Bay, October (Abstract)*.
- NAMBA S., KATO S., IWANAMI S., OYAIZU H., SHIOZAWA H., TSUCHIZAKI T. (1993). Detection and differentiation of plant-pathogenic mycoplasma-like organisms using polymerase chain reaction. *Phytopathology*, 83, 786-791.
- RAGOZZINO A., ANGELACCIO C., STEFANIS D. (1977). Su alcune malattie da micoplasmi rinvenute in Campania. *Annali della Facoltà di Scienze Agrarie, Università di Napoli, Portici*, Ser. IV, 11, 1-10.
- SAMBROOK J., FRITSCH E.F., MANIATIS T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. USA.
- SCHAFF D.A., LEE I.-M., DAVIS R.E. (1992). Sensitive detection and identification of mycoplasma-like organisms by polymerase chain reactions. *Biochemistry Biophysics Research Communications*, 186, 1503-1509.
- SCHNEIDER B., AHRENS U., KIRKPARTICK B.C., SEEMULLER E. (1993). Classification of plant-pathogenic mycoplasma-like organisms using restriction-site analysis of PCR-amplified 16S rDNA. *Journal of General Microbiology*, 139, 519-527.
- VIBIO M., BERTACCINI A., LEE I.-M., DAVIS R.E., CLARK M.F. (1996). Differentiation and classification of aster yellows and related European phytoplasmas. *Phytopathologia mediterranea*, 35: (in corso di stampa).