

METODOLOGIE ANALITICHE A CONFRONTO PER LA DIAGNOSTICA DI *PSEUDOMONAS SYRINGAE* PV. *ACTINIDIAE*

S. ZUCCHERELLI, C. FIUMANA, B. GIUFFRIDA, G. RICIPUTI
Sicural* s.r.l. consortile – Via Dismano, 2855, 47522 Cesena (FC)
szuccherelli@sicural.it

RIASSUNTO

Pseudomonas syringae pv. *actinidiae* (PSA) è l'agente del cancro batterico del kiwi. E' difficile da riconoscere e le fasi stagionali e fenologiche della pianta ospite influiscono sulla sua crescita e mobilità. In questo studio abbiamo utilizzato sia la tecnica molecolare della Polymerase Chain Reaction (PCR) che la coltura su piastra con vari terreni nutritivi a confronto. La PCR può essere utilizzata immediatamente per analizzare il tessuto vegetale oggetto di indagine. In parallelo le analisi su piastra, corredate dalle conferme biochimiche, costituiscono un'utile integrazione e verifica dell'indagine molecolare di partenza. Infine la PCR può confermare la positività delle colonie cresciute e ritenute sospette. Fra i terreni nutritivi agarizzati ne abbiamo messo a punto uno, denominato BEA, che presenta un buon equilibrio fra percentuale di isolamento del batterio, velocità ed entità di crescita, nonché specificità morfologica delle colonie, rispetto al terreno NSA. La complessità di PSA esige pertanto un approccio diagnostico con metodi diversi, da ripetere a vari intervalli di tempo, e nei periodi di maggior manifestazione dei sintomi della malattia.

Parole chiave: PSA, PCR, kiwi, morfologia, colonie, Italia

SUMMARY

A COMPARISON OF ANALYTICAL METHODS FOR THE DIAGNOSIS OF *PSEUDOMONAS SYRINGAE* PV. *ACTINIDIAE*

Pseudomonas syringae pv. *actinidiae* (PSA) is the agent of the bacterial cancer of kiwifruit. It is difficult to recognize and moreover the phenological stages of the season and of host plant may affect its growth and mobility. In this study, we used both the molecular technique of Polymerase Chain Reaction (PCR), and the culture plate comparing different nutritive agars. PCR can be used immediately to analyze the plant tissues under investigation. In parallel the analysis onto plates, accompanied by biochemical confirmations, may integrate and confirm the molecular analysis. Finally, PCR can be performed to confirm the positivity of the colonies grown and believed to be suspicious. We compared different nutrient agars, and among them we have identified one, called BEA, which shows a good balance between the isolation percentage of bacteria, speed and extent of growth, and specific morphology of colonies, compared with NSA. The complexity of PSA therefore requires a diagnostic approach using different methods, to repeat at various intervals of time and during the periods of greatest manifestation of disease symptoms.

Keywords: PSA, PCR, kiwifruit, morphology, colonies, Italy

INTRODUZIONE

Pseudomonas syringae pv. *actinidiae* (PSA) è l'agente del cancro batterico del kiwi. Si tratta di una patologia di tipo vascolare che causa sui tralci e sul tronco della pianta tipici cancri accompagnati dalla produzione di un essudato di colore variabile.

Sui fiori e sui boccioli si possono manifestare imbrunimenti di color nocciola (Balestra *et al.*, 2009), i frutti avvizziscono, e infine si può avere la morte della pianta. Il batterio è stato isolato ufficialmente per la prima volta nel 1984 in Giappone (Serizawa *et al.*, 1989). In Italia la malattia è stata rilevata nel 1994, ma fino agli ultimi anni non ha fatto registrare grossi danni. Dal 2007 sintomi riconducibili a PSA sono stati ripetutamente osservati nel Lazio, in provincia di Latina e di Roma, in particolar modo a carico di piante di *Actinidia chinensis* cv Hort 16 A, il cosiddetto kiwi a polpa gialla, e in misura minore a carico di impianti di *A. deliciosa* cv Hayward, il kiwi a polpa verde.

Oggi la PSA è ormai presente in tutte le principali regioni dove si effettua la coltivazione del kiwi, per cui è a serio rischio la posizione del nostro paese quale leader mondiale nella produzione di questo frutto. La diagnosi precoce della malattia e l'eliminazione tempestiva delle piante infette rappresentano le uniche armi per sconfiggere il batterio e contenerne i danni. In Emilia-Romagna sono state disposte misure di emergenza per prevenire la malattia e limitarne la diffusione (deliberazione della Giunta regionale n. 1280 del 6 settembre 2010). Sono stati altresì concessi contributi agli agricoltori obbligati ad estirpare le piante infette (deliberazione della Giunta regionale n. 1438 del 27 settembre 2010).

Il quadro evolutivo del cancro batterico su *Actinidia* è influenzato dall'andamento climatico e dallo stadio fenologico della pianta ospite. La diagnosi della malattia deve prevedere metodi che tengano conto del ciclo del batterio, della sua mobilità e dei periodi di latenza. L'identificazione di *Pseudomonas* viene condotta utilizzando metodi tradizionali come la crescita in piastra su terreni specifici, reazioni enzimatiche, analisi morfologica e microscopica delle colonie. Gli isolati di PSA rinvenuti ad oggi in Italia si contraddistinguono per la morfologia tipica della colonie che sono circolari, convesse, con bordi a volte ondulati, di diametro di 2-3 mm e di colore bianco (Mazzaglia *et al.*, 2010). Inoltre essi mostrano alcune caratteristiche biochimiche che li contraddistinguono non solo dalle altre specie ma anche dagli altri patovar di *P. syringae* (Vanneste *et al.*, 2010), fra le quali negatività al test dell'ossidasi e al test dei nitrati. La diffusione della tecnica PCR (Polymerase Chain Reaction) ha migliorato significativamente la specificità dei test diagnostici e ha ridotto il tempo necessario per il rilevamento di patogeni (Zaccardelli *et al.*, 2010). In particolare partendo da una vasta collezione di ceppi di varia provenienza, i profili molecolari hanno mostrato che i ceppi di PSA italiani sono fra loro identici, mentre sono state rilevate delle differenze fra ceppi italiani e i ceppi asiatici (FreshPlaza, 2011; Balestra *et al.*, 2011 *in press*).

Le coppie di primers raccomandate per la PCR diretta alla diagnosi di PSA sono descritti da Scortichini *et al.*, 2002, Vanneste *et al.*, 2010, Rees-George *et al.*, 2010, Andersen *et al.*, 1998.

Ad oggi non esiste un protocollo ufficiale per la diagnosi in laboratorio di PSA, che peraltro non è stato ancora annoverato fra gli organismi da quarantena. Il presente lavoro si propone di mettere a punto un approccio di analisi con metodologie diverse per individuare e confermare la presenza di PSA nei tessuti e nel polline di kiwi.

MATERIALI E METODI

I metodi utilizzati in questo studio sono metodi tradizionali di microbiologia classica, che prevedono la crescita di colonie batteriche su piastra, a confronto con metodi di biologia molecolare che si basano sulla tecnica PCR.

Il materiale vegetale (foglie sane e foglie infette da PSA, polline e corteccia di kiwi) sono stati raccolti da impianti di kiwi dell'Emilia-Romagna. Data la difficoltà di reperire standard di ceppi di PSA italiani certificati, le colture batteriche utilizzate in questo studio sono state ottenute tramite isolamento da foglie di kiwi raccolte in impianti di sicura infezione. E' stato quindi estratto il DNA dai materiali vegetali che costituiscono il bersaglio del batterio PSA,

ovvero da foglia, corteccia e polline, utilizzando il kit DNA plant (InCura) e seguendo le indicazioni del fornitore. Sono state leggermente modificate le condizioni di estrazione a seconda della tipologia di matrice.

La PCR specifica per rilevare la presenza di PSA nei tessuti è stata eseguita utilizzando il kit Full Reagen Set per analisi molecolare di PSA tramite end point PCR (Ipad Lab). Come controlli positivi sono stati utilizzati: il controllo positivo incluso nel Kit e DNA di materiale già accertato positivo. Come controlli negativi sono stati utilizzati acqua milliQ, il campione negativo incluso nel Kit, DNA da foglie di frutteto non infetto, polline e corteccia provenienti da frutteti sani. Per la PCR si è utilizzato un Thermal cycler Applied Biosystem 9700, applicando le condizioni indicate dal fornitore del Kit. Il prodotto finale, in caso di positività, è un amplificato di 280 bp, visibile su gel di agarosio TBE 1X al 2%. Se il campione caricato su gel presenta tale banda, ciò indica la presenza di PSA, e quindi l'infezione del tessuto analizzato. La separazione elettroforetica è avvenuta su apparato orizzontale Biorad, e i frammenti sono stati visualizzati utilizzando l'intercalante Syber Safe (Invitrogen) e il sistema di transilluminazione Geldoc 2000 (Biorad).

Contemporaneamente all'allestimento della PCR sono state prelevate porzioni di tessuto da foglia o corteccia sintomatiche (nella zona di confine fra tessuto necrotico e tessuto verde) e da foglia o corteccia asintomatiche, corrispondenti a 0,04 g, e sono state messe in 5 ml di soluzione sterile di Maximal Recovery Diluent (Biogenetics) con aggiunta dell'1% di peptone. Per il polline si è pesata la stessa quantità sopra indicata aggiungendo però 10 ml di Maximum Recovery Diluent. Il materiale vegetale è stato lasciato in questa soluzione a 20-22 °C per due ore. Dalla sospensione di partenza sono state eseguite diluizioni in serie 1:5 e da ciascuna di esse 0,1 ml sono stati spatolati su piastre Petri da 150 mm di diametro contenenti i terreni di coltura NSA, King B ed MSA (3 piastre per ciascuna tipologia di terreno), poste poi ad incubare a 22 °C per 3 giorni. Successivamente sono state eseguite ulteriori prove modificando i componenti e le loro quantità rispetto ai tre terreni valutati inizialmente. I terreni analizzati sono stati MSA, B1 semiselettivo (Surico *et al.*, 1989), King B, e tre terreni messi a punto presso il nostro laboratorio, denominati: BEA (Nutrient Agar 10,75 g, saccarosio 25 g, $K_2HPO_4 \cdot 3 H_2O$ 0,98 g, $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ 0,2 g, glicerolo 5 ml, acqua distillata 500 ml), BEA₁ (Mac Conkey Agar 25,75 g, glicerolo 5 ml, saccarosio 25 g, $K_2HPO_4 \cdot 3 H_2O$ 0,98 g, $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ 0,2 g, acqua distillata 500 ml) e BEA₂ (Cetrimide Agar 22,65 g, glicerolo 5 ml, saccarosio 25 g, acqua distillata 500 ml). Fra i parametri valutati si è verificata la crescita, la morfologia, la dimensione e la percentuale di isolamento delle colonie rispetto al terreno NSA (tabella 1). Al termine dei 3 giorni di crescita si è eseguita la PCR di conferma sulle colonie sospette utilizzando il kit Ipad Lab. I test dell'ossidasi (Oxoid) e dei nitrati (Liofelchem) sono stati utilizzati, unitamente alla PCR, per confermare l'identità delle colonie sospette.

RISULTATI

Per quanto riguarda i metodi tradizionali i migliori risultati, intesi come buon equilibrio fra entità, modalità di crescita, morfologia delle colonie e selettività si sono ottenuti con il mezzo agarizzato denominato BEA (tabella 1, foto 1). Il test dell'ossidasi e il test dei nitrati hanno confermato, unitamente al test PCR (foto 2), la positività del materiale sospetto. Il terreno MSA, che ha una elevata concentrazione di NaCl, al contrario non ha consentito alcuna crescita batterica. Il King B, indicato per *Pseudomonas*, si comporta come BEA₁ e BEA₂. Nelle nostre condizioni sperimentali questi ultimi tre terreni hanno dato esiti meno soddisfacenti per quanto riguarda i parametri analizzati perché nonostante la buona percentuale di isolamento, non c'è sufficiente specificità di riconoscimento delle colonie. Il

terreno B₁ non ha dato né buona percentuale di isolamento né facile riconoscimento delle colonie rispetto a BEA.

Per quanto riguarda i metodi di screening rapidi, la PCR ha consentito di confermare, nel caso di tessuti sicuramente infetti e nel giro di 24 ore, la positività dei risultati attesi. Nel caso di risultati negativi (assenza della banda a 280 bp, foto 2) per avere un'ulteriore conferma del risultato, la PCR è stata eseguita dopo 3 giorni anche sulle colonie sospette ottenute dalle colture in piastra.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I metodi tradizionali di caratterizzazione batterica sono semplici, adattabili e non dispendiosi. Tuttavia sono lenti e laboriosi; la crescita microbica, in condizioni di laboratorio può richiedere diversi giorni. La rapidità del risultato invece può essere fondamentale, nel caso in cui si debbano intraprendere delle misure di intervento tempestive. Talvolta le crescite batteriche su piastra non permettono di effettuare identificazioni precise, in particolare nel caso di ceppi appartenenti alla specie *P. syringae*. In questo studio il metodo tradizionale della crescita batterica su piastra ci ha permesso di individuare un mezzo di coltura agarizzato, chiamato BEA, che consente di ottenere un buon isolamento (68%) e di identificare il batterio PSA in base alla morfologia delle colonie, che risultano convesse/pulvinate, bianco opache e con al centro formazioni tipiche che fanno assomigliare la colonia ad un chicco di caffè (tabella 1 e foto 1). Il terreno Nutrient Sucrose Agar (NSA), utilizzato come terreno base di riferimento, è un mezzo complesso che contiene una miscela di amminoacidi, peptidi, acidi nucleici, grassi e polisaccaridi, così come vitamine e tracce di minerali. Pertanto supporta la crescita di un ampio spettro di microrganismi. Nella nostra esperienza NSA non è soddisfacente per consentire, da solo, l'identificazione delle colonie di PSA sospette. Infatti esso non è in grado di differenziare morfologicamente le colonie così come il terreno BEA, anche se quest'ultimo ha una percentuale di isolamento inferiore.

La PCR offre molti vantaggi rispetto ai metodi basati sulle colture in piastra, e ad altri metodi standard per il rilevamento di patogeni. I principali vantaggi sono specificità, sensibilità, rapidità, accuratezza e capacità di rilevare piccole quantità di un DNA bersaglio in un campione complesso. Poiché la PCR amplifica il DNA di un organismo, ciò permette, nel caso di patogeni batterici, di superare il problema di rilevare cellule vitali ma non coltivabili. Occorre però fare molta attenzione a possibili contaminazioni che potrebbero indurre ad avere falsi positivi.

I saggi biochimici dell'ossidasi e dei nitrati supportano infine gli altri criteri di riconoscimento e confermano il tipo di metabolismo del microrganismo oggetto di indagine.

La complessità e la mobilità di PSA impongono comunque di ripetere le analisi diagnostiche a vari intervalli di tempo in particolare nei periodi stagionali che favoriscono la manifestazione dei sintomi sulle piante ospiti.

Tabella 1. Confronto fra diversi parametri delle colonie cresciute su terreni agarizzati per la crescita di colonie di PSA. Per la descrizione delle colonie sono stati utilizzati i termini indicati da Seely Jr. *et al.*, 1997

	NSA	King B	B ₁	MSA	BEA	BEA ₁	BEA ₂
Diametro medio colonie (mm)	2,6	1,5	1,6	-	3,3	1,0	1,0
Colore colonie	bianco opaco satinato tendente al giallo con puntino centrale più opaco	bianche lucide leggermente tendenti al giallo	bianco opaco	-	bianco perlaceo effetto lucido con linea verticale che divide la colonia con aspetto tipo chicco di caffè	rosa	bianco
Margine colonie	intero	intero	intero	-	intero, a volte leggermente ondulato; colonie profilate di chiaro (effetto uovo)	intero	intero
Forma colonie	circolare/rotonda	circolare/rotonda	circolare/rotonda	0	circolare/rotonda	circolare/rotonda	circolare/rotonda
Profilo colonie	convesso tendente all'umbonato con l'invecchiamento della colonia	convesso	convesso	-	convesso tendente al pulvinato	leggermente convesse	poco convesse
% isolamento rispetto NSA	100	88	14	0	68	80	82
N. di colonie (media su 3 petri)	802,3 . 10 ²	706,0 . 10 ²	111,3. 10 ²	0	544,3. 10 ²	641,8. 10 ²	657,8. 10 ²

Foto 1. Colonie del batterio PSA cresciute su mezzo nutritivo BEA

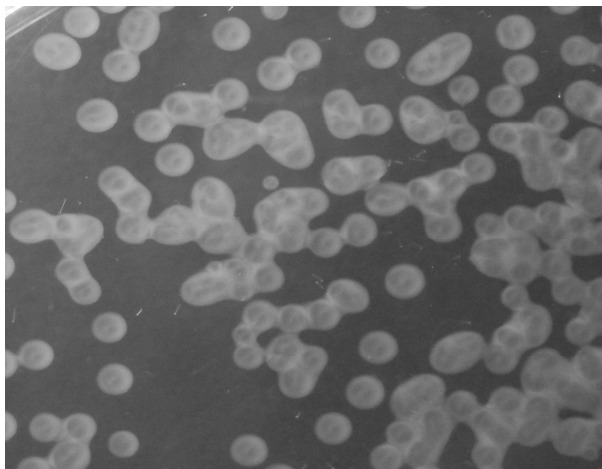
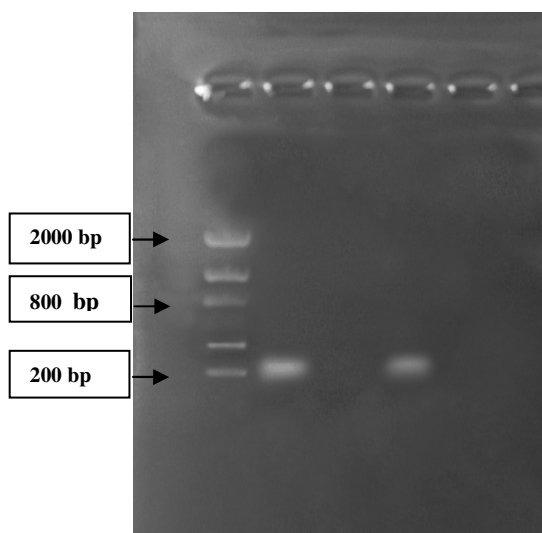


Foto 2. Risultato della PCR specifica per PSA su kiwi. Da sinistra verso destra: ladder del peso molecolare, controllo positivo del Kit, Controllo negativo del Kit, DNA di foglia di kiwi infetta, e infine due campioni di DNA di foglie non infette. La positività è segnalata dalla banda a 280 bp



LAVORI CITATI

- Andersen M.T., Beever R.E., Gilman A.C., Liefting L. W., Balmori E., Beck D.L., Sutherland P.W., Bryan G.T., Gardner R.C., Forster R.L.S. 1998. Detection of Phormium yellow leaf phytoplasma in New Zealand flax (*Phormium tenax*) using nested PCRs. *Plant Pathology*, 52, 371-378.
- Balestra G.M., Mazzaglia A., Quattrucci A., Renzi M., Ricci L., Rossetti A., 2009. Cresce la diffusione in Italia del cancro batterico dell'actinidia. *L'informatore Agrario*, 24, 59-62.
- Balestra et al., 2011. Canadian Journal of Plant Pathology (in press). Fresh Plaza 25/08/2011.
- Mazzaglia A., Renzi M., Taratufolo M.C., Gallipoli L., Bernardino R., Ricci L., Quattrucci A., Rossetti A., Balestra M.G., 2010. Cancro batterico dell'actinidia: il punto della situazione in Italia. *Frutticoltura* 9: 66-76.
- Rees-George J., Vanneste J.L., Cornish D.A., Pushparajah I.P.S., Yu J., Templeton M.D., Everett K.R. 2010. Detection of *P. syringae* pv. *actinidiae* using polymerase chain reaction (PCR) primers based on the 16S-23S rDNA intertranscribed spacer region and comparison with PCR primers based on other gene regions. *Plant Pathology*, 1-12.
- Scortichini M., Marchesi U., Di Prospero P., 2002. Genetic relatedness among *Pseudomonas avellanae*, *P. syringae* pv. *theae* and *P. s.* pv. *actinidiae*, and their identification. *European Journal of Plant Pathology*, 108, 269-278.
- Seeley H.W. Jr., Vandemark P.J., Lee J.J., 1997. Microbes in action. *In: A laboratory manual of microbiology*, Fourth Edition, W.H. Freeman and Company, New York.
- Serizawa S., Ichikawa T., Takikawa Y., Tsuyumu S., Goto M., 1989. Occurrence of bacterial canker of kiwifruit in Japan Description of symptoms, isolation of pathogen and screening of bactericides. *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, 55, 427-436.
- Surico G., Lavermicocca P. 1989. A semiselective medium for the isolation of *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*. *The American Phytopathology Society*, 79 (2), 185-190.
- Vanneste J.L., J. Yu, Cornish D.A. 2010. Molecular characterisations of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* strains isolated from the recent outbreak of bacterial canker on kiwifruit in Italy. New Zealand. *Plant Protection*, 63, 7-14.
- Zaccardelli M., Scortichini M., Campanile F., Sigillo L., Loreti S. 2010. Metodi avanzati di diagnosi fitobatterologica. *Protezione delle colture*, 1, 5-14.