



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA
VITERBO**

FACOLTÀ DI AGRARIA
DIPARTIMENTO DI PROTEZIONE DELLE PIANTE

DOTTORATO DI RICERCA IN PROTEZIONE DELLE PIANTE

- XVIII CICLO -

***Analisi genetica e molecolare dei batteri implicati nella
“moria” del nocciolo***

AGR/12

Dottoranda

DOTT.SSA CRISTINA PROIETTI ZOLLA

Coordinatore

CHIAR.MO PROF. NALDO ANSELMINI

Tutore

CHIAR.MO PROF. LEONARDO VARVARO

Co-tutore

CHIAR.MO PROF. ROSARIO MULEO

.....ai miei genitori

Ringraziamenti

Desidero anzitutto ringraziare Tonino Del Re per il tempo dedicatomi e per l'aiuto fornitomi negli ultimi due anni nell'analizzare tutte le sequenze e i risultati degli AFLP. Per avermi accompagnato ed ospitato a Bari, ma soprattutto per la sua simpatia.

Vorrei ringraziare la Dott.ssa Mulè del CNR di Bari per avermi ospitato nel suo laboratorio per una settimana per mettere a punto la tecnica degli AFLP e vorrei ringraziare in modo particolare il Dott. Gaetano Stea e la Dott.ssa Antonella Susca per la loro infinita disponibilità e per il loro continuo supporto.

Grazie anche al prof. Ruzzi per i suoi preziosi consigli e per la sua disponibilità.

Un grazie particolare allo staff e agli studenti del prof. Muleo e in particolare a Dario, Paolo e Carole per la loro amicizia e per il loro aiuto.

Grazie anche ai miei colleghi dottorandi che mi hanno sempre incoraggiato e consigliato, e agli studenti, assegnisti e tecnici del Dipartimento di Produzione delle Piante per avermi saputo sempre rallegrare anche nei momenti di difficoltà.

E ancora il ringraziamento più speciale va a Danilo perché negli ultimi tre anni mi è stato vicino con il suo amore e la sua infinita pazienza.

INDICE

Capitolo 1 Introduzione generale	1
1.1 Il Nocciolo	1
1.2 Descrizione botanica	2
1.3 Propagazione	4
1.4 Habitat	5
1.5 Produzione	5
1.6 La corilicoltura nel Viterbese	7
1.7 Principali avversità biotiche del nocciolo	9
1.8 Moria del nocciolo	11
1.9 Diagnosi dei batteri patogeni delle piante	13
1.9.1 Metodi tradizionali	14
1.9.2 Metodi basati sulla PCR	16
1.10 <i>Pseudomonas avellanae</i>	17
1.11 <i>Erwinia</i> spp	19
1.12 Scopo del lavoro	21
 Capitolo 2 Materiali e metodi generali	 22
2.1 Isolati batterici	22
2.2 Substrati per la crescita	24
2.3 Conservazione dei batteri a -80°C	26
2.4 Estrazione rapida del DNA	26
2.5 Estrazione del DNA con il kit Quiagen	27
2.6 Polymerase chain reaction (PCR)	28
2.6.1 Un tipico ciclo di PCR	28
2.7 PCR con primer specifici	29
 Capitolo 3 Analisi 16S degli isolati batterici	 31
3.1 La tecnica del 16S	31
3.2 Materiali e metodi	34
3.2.1 Primer 16S	34
3.2.2 PCR con primer 16S	36
3.2.3 Sequenziamento	37
3.2.4 Dendrogramma	37
3.3 Risultati	38
3.3.1 Identificazione dei batteri isolati da materiale sintomatico	38
3.3.2 Identificazione dei batteri isolati dall'insetto <i>Anisandrus dispar</i>	42
3.3.2.1 Tramite analisi 16S	42
3.3.2.2 Tramite primer specifici	44
3.3.3 Analisi filogenetica	45

3.3.4 Confronto tra ceppi di <i>P. avellanae</i> Greci e della provincia di Viterbo	47
3.4 Discussione	50
Capitolo 4 Analisi AFLP dei batteri	52
4.1 Le tecniche di fingerprinting del DNA	52
4.1.1 Caratteristiche generali degli AFLP	52
4.1.2 Principali passaggi della tecnica degli AFLP	54
4.2 Materiali e metodi	58
4.2.1 AFLP (Amplified fragment length polymorphism)	58
4.2.2 Legame degli adattatori ai frammenti di restrizione	58
4.2.3 Amplificazione preselettiva	59
4.2.4 Amplificazione selettiva	60
4.2.5 Analisi dei frammenti mediante sequenziatore automatico	61
4.2.6 Costruzione del dendrogramma	62
4.3 Risultati	63
4.3.1 Analisi AFLP dei batteri analizzati con primer 16S	63
4.3.2 Analisi AFLP degli isolati di <i>P. avellanae</i>	65
4.4 Discussione	70
Capitolo 5 Sviluppo di marcatori SCAR da frammenti AFLP	72
5.1 I Marcatori SCAR (Sequence characterized amplified regions)	72
5.2 Materiali e metodi	75
5.2.1 Metaphore agarose	75
5.2.2 Estrazione di DNA dal gel metaphore	75
5.2.3 Clonaggio dei prodotti PCR utilizzando il kit PROMEGA	77
5.2.4 Selezione ed isolamento dei cloni positivi	78
5.2.5 Estrazione del plasmide	79
5.2.6 Preparazione dei campioni per il sequenziatore	80
5.2.7 Disegno di primer SCAR	80
5.2.8 PCR con i primer SCAR	81
5.3 Risultati	82
5.4 Discussione	88
Capitolo 6 Conclusione	90
Bibliografia	92

CAPITOLO 1 INTRODUZIONE GENERALE

1.1 Il Nocciolo

Il nocciolo (Figura 1.1) ha origini preistoriche: fossili ritrovati in Svezia, Danimarca e Germania, attestano che il nocciolo faceva parte della dieta dell'uomo primitivo. L'origine del nocciolo sembra essere l'Asia dalla quale si estese in Europa, dove costituisce una delle più antiche coltivazioni agricole.



Figura 1.1. Il nocciolo

Botanicamente il nocciolo appartiene all'ordine delle *Fagales* e alla famiglia delle *Betulaceae*, alla quale appartengono altre specie forestali e ornamentali suddivise in due sezioni in base alle caratteristiche del frutto: le *Betuleae* (*Betula*, *Alnus*) e le *Coryleae* (*Corylus*, *Carpinus*, *Ostrya*). Alcuni botanici separano le *Coryleae* dalle *Betulaceae* e le elevano al rango di famiglia, con il nome di *Corylaceae*.

Corylus avellana L. è una delle specie riconosciute del genere ognuna delle quali produce nocciole edibili che vengono raccolte dall'uomo e sono importanti risorse per l'alimentazione. Il nome *Corylus* deriverebbe dal greco *corulos* che significa piccola noce, o da *corus* che significa elmo, per le brattee che ricoprono i frutti. Il nome della

specie (avellana) è invece derivato da avellane, termine con cui le nocciole erano chiamate nel secolo scorso in Inghilterra. Tale denominazione si riferiva ai centri di grande produzione di Avellino in Italia o di Abella in Turchia. Il termine inglese “filbert” deriva invece dal fatto che le nocciole maturano intorno al giorno di San Filiberto, il 20 Agosto. Altri storici credono che il termine “filbert” derivi dal tedesco “vollbart” che significa “folta barba” un riferimento all’apparenza del frutto sgusciato.

E' coltivato come pianta da frutto in numerose regioni; i frutti (nocciole) hanno seme edule, ricco di olio, che è usato nell' alimentazione, nell'industria dei colori e in profumeria. Il legno biancastro, di qualità mediocre e ridotte dimensioni è impiegato soprattutto per pali, botti, o come combustibile per produrre carbone. Vengono coltivate numerose varietà da frutto e ornamentali: tra queste ultime ci sono la var. pendula, la var. contorta, a portamento tortuoso, e la var. fusco-rubra, a foglie porporine.

1.2 Descrizione Botanica

Il Nocciolo è un arbusto caducifoglio, generalmente non supera i 5-6 metri ma più raramente può diventare un albero di 20 metri di altezza. Ha portamento arbustivo con numerosi fusti eretti, ramificati sin dalla base. La chioma è allargata, fitta e ampia con diametro massimo di 4 metri. Si presenta piuttosto irregolare o smembrata in varie fronde. Dalla ceppaia e dalle radici nascono germogli che danno origine a nuovi fusti e nuove piante sino a formare delle vere e proprie macchie. Si tratta infatti di una pianta con elevata attitudine ad emettere polloni.

Il tronco ha corteccia liscia e compatta, solo leggermente screpolata. Il legno è di colore bianco-rossastro, senza variazioni intense di colore, con anelli di accrescimento annuale regolari e poco appariscenti.

I rami sono flessibili e hanno un andamento eretto, con corteccia sottile (pochissimi millimetri anche nei fusti grossi), di color dal verde al brunastro ramato, liscia e lucida, ornata di numerose lenticelle chiare e orizzontali.

Le foglie (Figura 1.2) sono con margine seghettato, piccioli lunghi 1-2 cm, con una superficie fogliare superiore pelosa, color verde scuro; quella inferiore si presenta coperta da fine peluria, più chiara di quella superiore e vellutata.



Figura 1.2 Nocciolo comune - da Thomé
Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz 1885

Le gemme hanno forma ovoidale con l'apice schiacciato, disposte in modo alternato e protette da spesse perule.

I fiori sono precoci e riuniti in infiorescenze unisessuali (pianta monoica) che si sviluppano molto prima delle foglie, da gennaio ad aprile. Quelli maschili (Figura 1.2), visibili sin dal periodo invernale, sono sprovvisti di involucro e sono riuniti in spighe giallastre e pendenti (amenti) lunghi 2-8 cm. Con la fioritura, che avviene a fine inverno (da gennaio a marzo), prima della fogliazione, essi assumono un colore giallo dorato allungandosi sino ad oltre 10 cm. I fiori femminili (Fig. 1.2), singoli o in piccoli gruppi di 2-4, assomigliano a minuscole gemme con un ciuffetto rossastro all'apice; sono disposti sugli stessi rami dei fiori maschili, riuniti e racchiusi da brattee verdastre, poco visibili, dalle quali spuntano gli stami filiformi e rossi che ricevono il polline dei fiori maschili. Il polline si diffonde con il vento a fine inverno-primavera, ma la fecondazione avverrà solo successivamente con la formazione completa dell'ovario.

Il nocciolo è una specie monoica e diclina, quindi sulla stessa pianta porta fiori maschili e femminili che hanno periodi di maturazione e di sviluppo differenti. La fioritura degli organi maschili può precedere (proterandia) o seguire (proteroginia) quella femminile, oppure può verificarsi nello stesso periodo (omogamia). Ciò dipende dalla varietà e dall'andamento climatico precedente, in quanto i fiori femminili e

maschili, avendo esigenze in freddo diverse, possono svilupparsi differentemente. L'emissione del polline dura in media una settimana.

Il frutto (nocciola) (Figura 1.3) è un achenio racchiuso da due brattee che formano un involucro foliaceo, carnoso alla base, aperto e sfrangiato all'estremità.



Figura 1.3. Acheni contenente le nocciole

L'achenio è composto da un guscio esterno legnoso (pericarpo), di forma ovale globosa lungo 1,5-3 cm, contenente il seme vero e proprio, nocciola, edule, riuniti in gruppi di 1-4. La maturazione avviene a fine estate o in settembre in relazione all'altitudine e al clima.

1.3 Propagazione

Il nocciolo non riproduce per seme gli stessi caratteri della pianta madre, per cui per mantenere le caratteristiche della cultivar, ha bisogno di essere propagato per via vegetativa.

Il sistema di propagazione più usato è quello per pollone radicato, che viene staccato dalla base del tronco e posto direttamente a dimora. Questo metodo di propagazione però è molto lento, poiché da ogni pianta si possono ottenere solo 5 o 6 polloni. Oppure viene adottata la tecnica di propaggine per trincea. Prima del germogliamento si scava alla distanza di un metro dalla pianta, una trincea in cui si adagiano rami di buone dimensioni piegati ad angolo stretto, in modo da determinare alla base della curvatura una costrizione della zona corticale, che provocherà l'emissione di radici nel tratto di ramo immediatamente superiore. I rami curvati vengono ricoperti da terreno ricco di sostanza organica; la parte che emerge è di 20-50

cm. In questa zona si formeranno dalle gemme nuovi germogli. Questa tecnica riesce a fornire tra le 20-30.000 piante per anno e per ettaro. Altri metodi sono possibili anche se più difficili e costosi come l'innesto, la margotta aerea e le talee.

1.4 Habitat

Pur non essendo una pianta longeva, è molto diffusa per le sue caratteristiche rustiche. Si adatta infatti ai terreni più diversi, avendo come unica necessità la presenza di sali minerali. Il substrato sul quale vegeta meglio e fornisce le migliori produzioni è quello permeabile, fertile, con pH da 5,5 a 7,8, con contenuto in calcare attivo inferiore all'8%. Il nocciolo è una pianta molto comune dalla zona mediterranea a quella appenninica, dove si spinge fino a 1200 m. Preferisce le regioni con inverni miti ed umidi ed estati fresche. Per questo motivo la maggior parte della produzione è localizzata vicino ad ampi corsi di acqua a medie latitudini (lungo il mar Nero in Turchia, le colline intorno ai laghi in Italia, la provincia di Tarragona in Spagna, la costa atlantica in Francia e la valle Willamette in Oregon).

Partecipa alla costituzione di boschi misti di latifoglie, prestandosi bene anche alla colonizzazione di suoli denudati e franosi. Viene spesso utilizzato per creare macchie su terre vergini, o per consolidare scarpate e luoghi soggetti a dissesto idrogeologico. La sua crescita è rapida, ma solitamente non vive più di 80-100 anni. A scopo paesaggistico-ambientale viene utilizzato per la creazione di siepi e macchie, ma più spesso è coltivato a noccioli per la produzione del frutto, del quale si utilizza il seme per consumo alimentare e per l'industria dolciaria ed oleifera.

1.5 Produzione

Dal 1961 la produzione mondiale di nocciole è cresciuta notevolmente passando dalle 182,275 tonnellate alle 699,840 tonnellate nel 2004. In accordo con la United Nations Food and Agriculture Organization (FAO), i cinque maggiori produttori di nocciole nel 2004/05 sono stati la Turchia con 490,000 tonnellate, seguita dall'Italia (86,000 tonnellate), gli Stati Uniti (39,920 tonnellate), l'Azerbaijan (19,895 tonnellate), e la Spagna (14,225 tonnellate). Nei due principali paesi produttori, però, si è assistito

ad un andamento abbastanza diverso; infatti, mentre negli ultimi quaranta anni la produzione turca è cresciuta di quasi 5 volte, quella italiana è poco più che raddoppiata passando dalle 55,379 tonnellate nel 1961 alle 86,000 tonnellate nel 2004 (Figura 1.4).

Produzione di nocciole

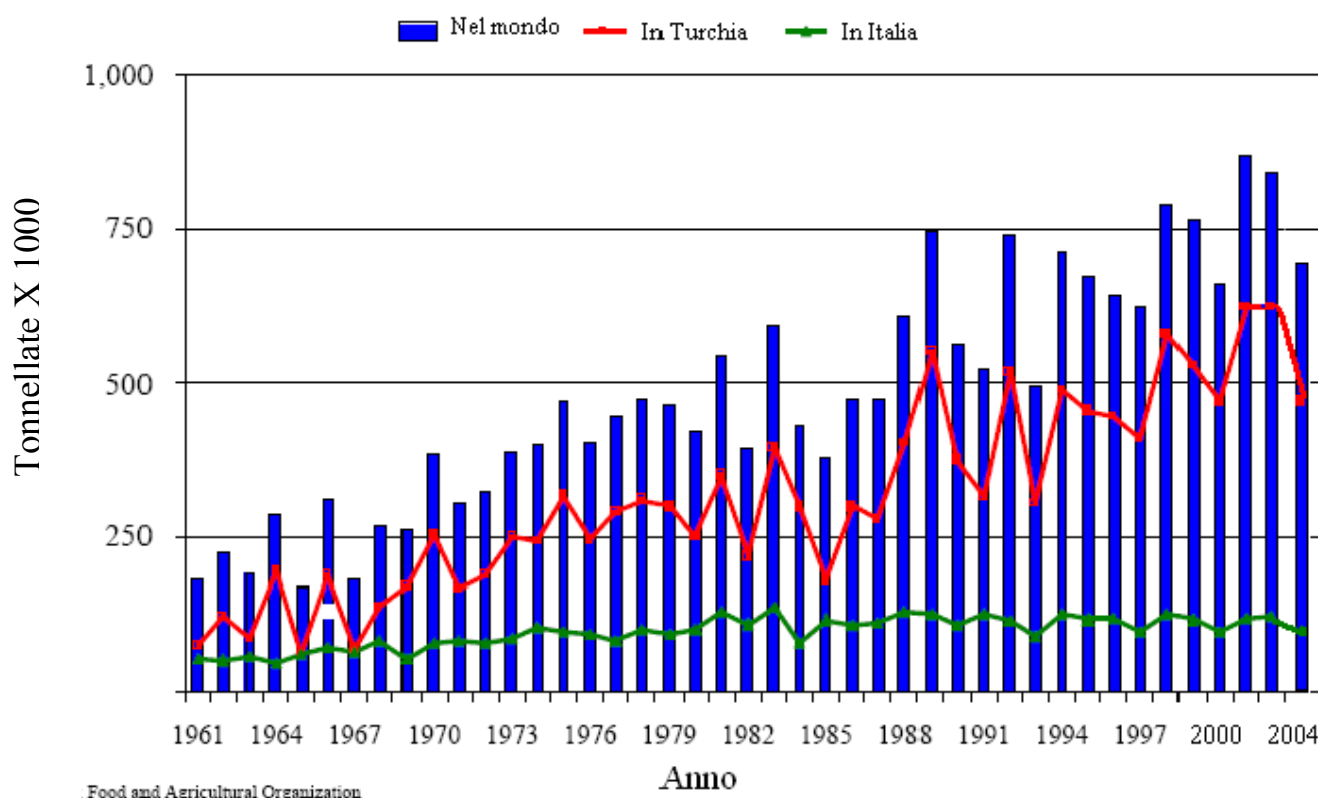


Figura 1.4. Dati sulla produzione mondiale di nocciole dal 1961 al 2004.

La maggior parte della produzione turca è destinata all'esportazione. Nel 2004 la Turchia ha esportato circa 400.000 tonnellate di nocciole, circa il 90% della produzione totale del paese e il 70% della esportazione mondiale facendo crollare il prezzo di circa il 50%. La maggior parte delle esportazioni turche di nocciole sono limitate ai paesi Europei, soprattutto alla Germania, ma anche all'Italia, Francia e Belgio.

E' per questo che l'Italia si trova di fronte ad una dura concorrenza per quanto riguarda le esportazioni. Qui, dopo un periodo di sensibile crescita durato fino all'inizio degli anni '90, si è osservata una stabilizzazione, e in qualche area addirittura una riduzione. Questo a causa sia dell'andamento del prezzo determinato dalle condizioni dell'offerta turca, sia della crescente variabilità dell'andamento climatico che incide in

modo significativo su settori, come quello nocciolicolo, che presentano un'offerta molto concentrata sul territorio.

La quasi totalità della produzione di nocciole italiana è localizzata in poche aree in cui è stato raggiunto un elevato livello di specializzazione. Ciò è dovuto sia alla presenza di un territorio naturalmente vocato per ragioni ambientali e climatiche, sia all'esistenza di un particolare contesto socio-economico nel quale si sono sviluppate conoscenze tecniche, strutture commerciali e relazioni umane (Dono e Franco, 2002).

A conferma di questa spiccata concentrazione territoriale basta osservare come oltre l'80% della produzione nazionale di nocciole sia concentrata in sole 4 regioni: Campania, Lazio, Piemonte e Sicilia. I dati della produzione riportati dall'ISTAT per il 2004 (anche se non coincidono con i dati della FAO) sono stati i seguenti: nel Lazio sono state prodotte 62.973 tonnellate, seguita dalla Campania con 53.613 tonnellate, dalla Sicilia con 18.000 tonnellate e infine dal Piemonte con 10.885 tonnellate. Il comprensorio viterbese risulta il più importante a livello nazionale con oltre un quarto delle superfici investite e quasi un terzo della produzione totale.

Le più importanti cultivar sono quelle native, per esempio 'Tonda gentile romana' nel Lazio, 'Tonda di Giffoni' nell'Avellinese, la 'Mortarella', 'San Giovanni', 'Camponica', 'Riccia di Talanico', 'Tonda Bianca' e 'Tonda Rossa' nel resto della Campania, 'Tonda Gentile delle Langhe' in Piemonte e 'Santa Maria de Jesu' in Sicilia.

1.6 La corilicoltura nel Viterbese

Nel Viterbese circa 19.000 ha sono coltivati a nocciolo, quasi la totalità della coricoltura regionale, e le aziende interessate sono circa 12.000 distribuite in 30 comuni. La coricoltura ha raggiunto questa dimensione negli anni '70 durante i quali, spinta da un mercato in espansione, si è intensificata nell'area lungo le pendici dei Monti Cimini, caratterizzati da condizioni climatiche favorevoli, e da qui si è espansa nel territorio ad essa circostante.

L'incremento delle superfici investite a nocciolo è avvenuto principalmente fra il 1970 e il 1985, mentre, nel periodo successivo, la crescita è progressivamente rallentata fino quasi ad annullarsi, soprattutto in conseguenza della forte riduzione del prezzo

delle nocciole che ha caratterizzato il mercato italiano dal 1985 al 1992. Nonostante la sostanziale stabilizzazione delle superfici, la produzione è continuata ad aumentare sia per la crescita delle rese produttive, legata al miglioramento delle tecniche produttive e dell'efficacia delle materie prime (fertilizzanti e fitofarmaci), che per la rapidissima evoluzione che ha riguardato la meccanizzazione della raccolta del prodotto. Comunque, anche nei periodi di maggiore espansione la coltura ha mantenuto una elevatissima concentrazione territoriale. Il 50% della superficie corilicola della provincia si concentra in soli 5 comuni (Carbognano, Capranica, Vignanello, Caprarola, Ronciglione). Tale concentrazione territoriale ha certamente agevolato lo sviluppo di efficienti mercati dei fattori produttivi e di servizi tecnici e commerciali per le imprese del settore.

La corilicoltura dei Cimini ha assunto ormai una struttura e un'organizzazione interna consolidata e complessa e va configurandosi a tutti gli effetti come un distretto agro-industriale (Bignami, 2002). La produzione di mezzi tecnici, quella di nocciole e la loro commercializzazione si basano, infatti, su imprese ben organizzate. In questo quadro operano delle Associazioni di produttori (Apnal, Apronvit, Assofrutti) che aggregano circa il 75% della produzione, utilizzando le misure di sostegno previste dai regolamenti comunitari e attuando i programmi operativi ed i piani di miglioramento.

I principali problemi della produzione corilicola provinciale derivano sia dal confrontarsi col mercato internazionale fortemente influenzato dall'andamento del raccolto in Turchia, sia dalle fitopatie cusate da parassiti che stanno provocando notevoli danni alle colture, in particolare "la moria". Per questo motivo l'associazione corilicola di Caprarola ASSOFRUTTI, dal 1998 ha iniziato ad usufruire di un indennizzo per l'estirpazione e successivo reimpianto di piante morte a causa della "moria".

Successivamente questa iniziativa è stata tramutata in legge (n°307 del 17/8/99) ed anche l'associazione APRONVIT e APNAL ora usufruiscono dei medesimi benefici. Grazie a questa legge (Gazzetta Ufficiale 210, 7 settembre 1999) "Disposizioni in materia di interventi del Fondo di solidarietà nazionale in favore delle aziende agricole danneggiate da fitopatologie di eccezionale gravità", sono stati stanziati fondi che, seppure limitati, incoraggiano il corilicoltore ad estirpare le piante morte o gravemente colpite ed a reimpiantare con polloni provenienti da piante madre sane.

1.7 Principali avversità biotiche del nocciolo

Il nocciolo viene considerato una pianta rustica che non necessita di particolari cure, cosicché i locali corilicoltori si limitano in genere a pochi interventi di tipo agronomico-culturale o fitoiatrico. A volte però fattori climatici avversi o errate pratiche agronomiche possono favorire la comparsa di fitopatie capaci di compromettere la produttività (Varvaro, 1993).

Principali malattie ad eziologia fungina:

- Mal dello stacco che causa lesioni e deperimenti alle parti legnose dovute al fungo *Cytospora corylicola* Sacc. La malattia fu osservata per la prima volta in Sicilia nel 1918 (Savastano, 1918). Sul nocciolo sono state segnalate 7-8 specie di *Cytospora* (Goidanich, 1964). I sintomi consistono in macchie brune, irregolari, sugli astoni da cui si ha l'emissione di guttule mucillaginose costituite da conidi del fungo. Successivamente il tessuto corticale e il legno sottostante necrotizzano. Tutte queste alterazioni rendono il cilindro legnoso più vulnerabile all'azione del vento e di altre spinte meccaniche; si ha così una spaccatura trasversale del fusto, in prossimità della zona necrosata, ed una longitudinale (da qui il nome della malattia) (Granata, 1985).
- Gleosporiosi, disseccamenti dei rametti di nocciolo causati dal fungo *Gloeosporium coryli* Desm. I sintomi si evidenziano alla ripresa vegetativa quando le squame esterne delle gemme infette risultano del tutto o in parte imbrunite. Sugli organi infetti si sviluppano i corpi fruttiferi del fungo i quali appaiono come piccoli punti neri, e successivamente piccole masse chiare costituite dai conidi del fungo. Le gemme infette possono morire ancora chiuse e l'infezione si propaga spesso anche al nodo portando a morte tutto il rametto. Un ruolo probabile di vettore può essere svolto dall'eriofide delle gemme *Phytoptus avellanae* (Viggiani, 1984a).
- Mal bianco delle foglie di nocciolo dovuto al fungo *Phyllactinia guttata* Lev. La malattia si manifesta in autunno con comparsa di macchie clorotiche sulla pagina superiore delle foglie e di una fitta rete di micelio biancastro con corpi

fruttiferi su quella inferiore. Le foglie infette ingialliscono e cadono prematuramente.

- Marciume delle radici causate dai funghi *Armillaria mellea* (Vahl.) e *Rosellinia necatrix* (Hart.) Berl. Le piante colpite presentano una vegetazione stentata, clorosi fogliare ed un deperimento più o meno rapido, fino all'avvizzimento dell'intera pianta. A livello delle radici si nota una fitta rete di micelio del fungo di colore bianco. I cordoni rizomorfi possono diffondersi alle altre piante.
- Maculature e seccume fogliare *Labrella coryli* (Desm. e Rob.) Sacc. e *Leptothyrium coryli* (Fuck). Sulle foglie compaiono delle macchie tondeggianti con contorni più scuri, cosparse di punteggiature nerastre formate da picnidi. I danni in genere non sono tali da giustificare degli interventi diretti con anticrittogamici (Noviello, 1968; Pesante, 1971).

Tra le malattie dovute a batteri le più importanti sono

- Batteriosi dovuta a *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina* (Miller *et al.*, 1940; Vauterin *et al.*, 1995)) che attacca i frutti e le gemme ma anche rami e foglie (Noviello, 1968). Il batterio produce aree brune sulle foglie e sulla cupola dei frutti ed aree necrotiche sui rami dalle quali esce un essudato.
- Moria del nocciolo (vedi par.1.8)

In Europa sono stati identificati più di 200 specie di insetti associati al nocciolo (Pavlenko e Gorbunov, 1985; Viggiani 1979, 1982, 1984, 1985, 1994). La maggior parte di essi sono benefici e solo meno del 30% sono considerati pericolosi.

Tra i parassiti animali più dannosi per il nocciolo ricordiamo:

- L'acaro eriofide *Phytoptus avellanae* Nal. che attacca le gemme del nocciolo;
- Gli afidi infestanti polloni, giovani germogli e foglie quali il *Corylobium avellanae* e il *Myzocallis coryli*;

- Il balanino *Curculio nucum*, che è l'insetto più dannoso per il nocciolo in Europa e in Asia, le cui larve infestano il frutto;
- La cerambice *Oberea linearis* che scava gallerie nel legno della pianta;
- Le cicaline, la cui infestazione provoca tipici schiarimenti sulle foglie;
- Diverse specie di cimici quali: *Gonocercus acuteangulatus*, la cimice verde *Nezara viridula* e *Palomena prasina*, ecc., le quali provocano infestazioni sulle giovani nocciole impedendo lo sviluppo del seme;
- Lo scolitide *Anisandrus dispar* F. La femmina di questo insetto scava delle gallerie sull'asse longitudinale del tronco in cui depone le uova. Oltre al danno diretto vi è anche una dannosità indiretta dovuta all'apertura di ferite nella pianta ed alla trasmissione passiva di agenti patogeni che possono favorire l'insorgere di malattie (Viggiani *et al.* 1979).
- Il coleottero *Xyleborinus saxeseni* Ratz. che attacca numerose specie arboree ma si riproduce solo su piante deperite o morte per altre cause.
- I lepidotteri defogliatori le cui larve possono provocare danni al fogliame

1.8 Moria del nocciolo

La “moria” del nocciolo è una delle malattie più gravi che ha colpito il nocciolo negli ultimi anni.

Essa è particolarmente diffusa nel centro Italia dove ha già distrutto migliaia di alberi.

La malattia si presenta con una serie di manifestazioni caratteristiche che si evidenziano a partire dalla primavera. Si nota dapprima l'indebolimento di una sola branca con le foglie che virano verso il verde sempre più pallido fino ad appassire. In una sola settimana la branca va incontro a morte e il tutto avviene così rapidamente che foglie e frutti rimangono attaccati ad essa (Figura 1.5).



Figura 1.5. A sinistra pianta di nocciolo colpita da “moria”. A destra un particolare della branca con le foglie rimaste attaccate.

Lungo le branche sono inoltre presenti delle macchie brune che segnalano zone di tessuto legnoso idropiche. Il marciume si estende successivamente al resto della pianta e anche se l'anno successivo si differenziano nuovi polloni, questi disseccano nel giro di qualche anno (Aloj *et al.*, 1987).

L'infezione dovrebbe avvenire in autunno quando la caduta delle foglie lascia degli spazi aperti attraverso le ferite fogliari. E' stato inoltre ipotizzato (Aloj *et al.*, 1987) il ruolo di un insetto, l'*Anisandrus dispar* F., nel determinare la malattia dal momento che la femmina, all'atto della formazione del nido, scava complesse gallerie per la deposizione delle uova. Oltre al danno diretto vi può essere una dannosità indiretta per l'apertura di ferite che possono essere veicolo di trasmissione per gli altri agenti patogeni (Viggiani *et al.*, 1979).

Anche fattori ambientali possono contribuire alla malattia. Per studiare questo legame, i dati sulla distribuzione spazio-temporale della malattia, ottenuti mediante studi di rilevamento satellitare (GPS), sono stati elaborati mediante sistemi geografici informatizzati (GIS) e correlati con i dati storici relativi al clima, la geologia, l'altimetria, l'idrografia, l'uso del suolo e la percentuale dei piante morte, forniti dall'ARSIAL e dalla regione Lazio. Questo ha permesso di comprendere che una maggiore piovosità, temperature minime invernali più basse, gelate tardive primaverili

sono correlati con un'alta significatività statistica alla presenza della malattia (Fabi *et al.*, 2004). Le gelate primaverili, ad esempio, sono molto frequenti in alcune aree dei colli Cimini e, pur non raggiungendo valori molto bassi, possono ripetersi per più giorni consecutivi. In queste situazioni, temperature di $-2/-3^{\circ}\text{C}$ possono provocare fenditure longitudinali lungo le branche e il tronco. Queste fenditure vengono colonizzate successivamente dal batterio proveniente dai cancri formatesi nell'autunno precedente (Scortichini, 2002).

Anche i terreni subacidi ($\text{pH} < 5,0$) contribuiscono ad aggravare ulteriormente la situazione. Soprattutto nei comuni di Vetralla, Capranica e Sutri, il pH del terreno può arrivare anche a valori di 4,2-4,5 (Scortichini *et al.*, 2001). In queste situazioni la pianta risulta "bloccata" e più vulnerabile nei confronti del patogeno. Quando coesistono gelate primaverili e terreni subacidi il rischio "moria" è molto elevato.

1.9 Diagnosi dei batteri patogeni delle piante

L'approccio necessario per la individuazione di ogni fitopatia è la determinazione ed identificazione dell'organismo responsabile. Una semplice diagnosi di un batterio patogeno già noto potrebbe richiedere solamente il riconoscimento dei sintomi e un test rapido per confermarne l'identità, ma la diagnosi di patogeni ancora sconosciuti richiede una più attenta osservazione in campo, un esame dei tessuti della pianta, l'isolamento del batterio patogeno, la sua caratterizzazione e infine la dimostrazione dei postulati di Koch (Stead *et al.*, 1997).

Molti metodi fenotipici come il profilo degli acidi grassi, proteico e nutrizionale consentono la determinazione e l'identificazione di molte specie di batteri. Questi metodi tradizionali però sebbene forniscano molte informazioni fenotipiche non sono in grado di determinare lo stato di pathovar della specie (Stead, 1991). Le procedure "standard" di identificazione dei batteri, o metodi classici, richiedono l'isolamento di colture pure seguito da test che analizzano alcune caratteristiche fenotipiche, quali i caratteri biochimici e morfologici. Se alcune di queste metodologie si sono rivelate efficaci per l'identificazione di alcuni batteri, resta il fatto che questi saggi servono, di solito, per identificare un numero relativamente ristretto di microrganismi e in genere non possiedono tutti quei requisiti che un buon protocollo per la identificazione e/o la

tipizzazione di un isolato batterico dovrebbe avere: specificità, sensibilità, riproducibilità, rapidità, semplicità e basso costo.

Oggi invece sono disponibili numerosi metodi di fingerprinting genetico basati sulla PCR che hanno un buon potenziale nel classificare ed identificare i batteri fino al livello di pathovar che hanno affiancato ed in parte soppiantato le tecniche "classiche". In particolare le tecniche basate sulla PCR (AFLP, AP-PCR, DAF, RAPD, rep-PCR, eric-PCR, tDNA-PCR, ARDRA, ITS, sequenziamento del 16S rDNA) si sono rivelate un mezzo estremamente veloce ed efficace per l'identificazione, la tipizzazione ed il monitoraggio dei batteri. Le varie tecniche, che differiscono oltre che per l'approccio operativo, anche per la loro specificità, generano un fingerprinting molecolare che assume le sembianze di un codice a barre, il numero delle quali dipende dal tipo di tecnica utilizzata. L'identificazione di un isolato batterico ignoto avviene mediante confronto con il codice a barre ottenuto con uno o più ceppi tipo (Morinet, 1992)

1.9.1 Metodi tradizionali

Per identificare un batterio è necessario anzitutto ottenere la sua coltura pura. L'isolamento dei batteri viene fatto strisciando una sospensione batterica su substrati nutritivi solidi che possono essere di quattro tipi: semplici, di composizione idonea alla crescita indiscriminata di batteri; differenziali, contenenti sostanze che danno reazioni differenti quando certi batteri crescono in loro presenza; selettivi, di composizione tale da inibire la crescita di batteri indesiderati; di arricchimento, particolarmente favorevoli alla moltiplicazione dei batteri.

Una volta ottenuta la coltura pura, vengono utilizzati test per studiare i caratteri biochimici. Il batterio sconosciuto viene esaminato ed i suoi caratteri sono comparati con quelli di batteri noti (ad esempio ceppi tipo). La scelta dei caratteri deve però essere ponderata pertanto è consigliabile che il numero delle osservazioni e dei saggi sia mantenuto al minimo indispensabile (Cowan e Liston, 1974).

Le prime tappe per l'identificazione dei batteri fitopatogeni sono l'osservazione microscopica in contrasto di fase, la colorazione di Gram, la determinazione del numero e della disposizione dei flagelli, del tipo di metabolismo del glucosio, se

respiratorio o fermentativo, (Hugh e Leifson, 1953) ed il saggio dell'ossidasi (Kovacs, 1956). Nel corso di questi saggi è possibile verificare inoltre se le colture del batterio producono pigmenti o posseggono qualche altro spiccato carattere macroscopico (ad esempio colonie levaniformi o pectolitiche).

Per presunti batteri fitopatogeni è anche importante effettuare il test di patogenicità: il batterio deve essere in grado di riprodurre, una volta inoculato artificialmente su piante sane, i sintomi tipici della malattia presente in natura. Se la prova dà esito positivo per poter affermare che il batterio è causa della malattia deve essere reisolato dai sintomi artificiali, devono cioè essere soddisfatti i postulati di Koch. A questo punto si può avere già un'idea del genere o addirittura della specie cui attribuire il ceppo esaminato (Mazzucchi, 1981). Questi metodi però non sono affatto rapidi.

La ditta Biolog Inc. di Hayward (CA-USA) ha velocizzato i saggi metabolici per l'identificazione dei microrganismi, mettendo a punto un sistema basato su piastre contenenti fino a 95 differenti substrati organici. Questi sono contenuti in forma liofilizzata in altrettanti pozzetti. Aggiungendo in ogni pozzetto la medesima quantità di sospensione batterica, a densità nota, il substrato si reidrata ed il pozzetto, in presenza di attività metabolica del batterio, si colora di viola con un'intensità teoricamente proporzionale all'utilizzo del substrato stesso. La lettura della piastra colorata viene eseguita tramite uno spettrofotometro per piastre a 96 pozzetti in grado di leggere alla lunghezza d'onda di circa 590 nm (specifica per il tipo di colorazione del sale di tetrazolio utilizzato). Ad ogni ceppo batterico saggiato corrisponde un profilo metabolico (o profilo di utilizzo dei substrati). La somiglianza o l'equivalenza del profilo ottenuto, con i profili registrati in un database della Biolog Inc., permette di risalire al genere, alla specie del batterio o, nella migliore delle ipotesi, alla pathovar.

Anche l'analisi gas-cromatografica degli acidi grassi rappresenta un metodo di diagnosi per i batteri fitopatogeni. In tali organismi infatti, la maggior parte degli acidi grassi cellulari presentano catene lunghe da 9 a 20 atomi di carbonio (Miller, 1982; Moss *et al.*, 1980); di questi, alcuni sono presenti anche nelle cellule di piante e animali, mentre altri (β -idrossi, ciclopropano e catene ramificate) sono presenti esclusivamente nei batteri (Lechevalier, 1982). La diversità nella struttura e la conformazione caratteristica, rendono tali composti adatti per l'identificazione dei batteri, identificazione basata sulla composizione specifica di acidi grassi totali.

Gli acidi grassi vengono estratti dai campioni in cultura e vengono separati mediante gas-cromatografia. Il profilo unico degli acidi grassi estratti viene analizzato mediante opportuni software informatici e viene comparato con un database microbico interno. Oltre il profilo degli acidi grassi, molti programmi forniscono anche una lista con i risultati degli accoppiamenti con i dati del database e un valore di probabilità statistica che indica il livello di confidenza del risultato.

1.9.2 Metodi basati sulla PCR

I metodi di identificazione dei ceppi basati sulla PCR possono essere riassunti in tre strategie:

- a) analisi di fingerprinting del cromosoma utilizzando tecniche di amplificazione mediante PCR;
- b) frammentazione con endonucleasi di restrizione del cromosoma batterico;
- c) amplificazione enzimatica di singoli geni e successiva analisi di sequenza dei prodotti PCR.

Molti progressi nella tipizzazione dei batteri sono stati raggiunti utilizzando tecniche di fingerprinting che impiegano la PCR per amplificare segmenti multipli di DNA batterico. Ad es. l'analisi degli elementi ripetitivi semplicemente chiamata REP-PCR si basa su parecchie famiglie di elementi ripetuti del DNA distribuiti nel cromosoma batterico. Questi possono servire come siti di legame per primer per una amplificazione del DNA (Versalovic *et al.*, 1991;1994; de Bruijn, 1992).

Parecchie famiglie di sequenze ripetitive sono intersperse attraverso il genoma di diverse specie batteriche. Tre famiglie di sequenze ripetute sono state studiate più in dettaglio, incluse le sequenze REP (repetitive extragenic palindromic), le sequenze ERIC (enterobacterial repetitive intergenic consensus), e gli elementi BOX (Versalovic *et al.*, 1994). L'utilizzo di questi primer in PCR consente l'amplificazione selettiva di distinte regioni genomiche localizzate tra le sequenze REP, ERIC o BOX. In modo simile all'analisi VNTR negli eucarioti, gli oligonucleotidi utilizzati nella REP-PCR determinano la misura dei polimorfismi amplificando le regioni di DNA comprese tra i

motivi ripetuti. In questo modo il pattern dei frammenti amplificati è in funzione della localizzazione fisica degli elementi ripetuti nel genoma.

Un altro approccio che si basa sulla frammentazione con endonucleasi di restrizione è l'analisi RFLP-PCR che prevede l'amplificazione di una porzione del DNA ottenuto utilizzando uno o più enzimi di restrizione.

L'analisi AFLP è un altro metodo di fingerprinting basato sulla PCR che si utilizza per discriminare batteri anche strettamente correlati. Il DNA batterico viene prima digerito con enzimi di restrizione producendo una serie di frammenti di DNA di varia lunghezza. Poi specifici adattatori a doppio filamento vengono legati alla fine di questi frammenti. Primer di sequenza complementare a quella degli adattatori e con vari oligonucleotidi selettivi al 3' sono infine utilizzati per amplificare questi frammenti.

Infine l'amplificazione del gene 16S rRNA e la successiva analisi di sequenza è un altro metodo molto utilizzato per l'identificazione dei batteri. Il DNA genomico è estratto direttamente dalle colonie batteriche e il gene del 16S rRNA è amplificato utilizzando primer universali tramite PCR. Il gene amplificato è poi sequenziato utilizzando un sequenziatore automatico e la sequenza analizzata con metodi bioinformatici per ricercare polimorfismi con le sequenze del 16S note di altre specie.

1.10 *Pseudomonas avellanae*

Nel Giugno del 1976 fu osservata una grave malattia su piante di nocciolo nel nord della Grecia che causava la morte di intere branche. I primi studi sulla eziologia della malattia non hanno lasciato dubbi sulla sua natura batterica. Il batterio isolato aveva le seguenti caratteristiche: era un Gram negativo, con 1 fino a 4 flagelli polari, produceva un pigmento fluorescente, aveva un metabolismo ossidativo del glucosio e induceva reazione di ipersensibilità su foglie di tabacco. Sulla base di queste caratteristiche il batterio fu classificato come *Pseudomonas* sp. (Psallidas e Panagopoulos, 1979). Fino a quel momento non era stato riportato nulla in letteratura di una simile malattia su nocciolo causata da pseudomonadi. Più tardi studi di tipo morfologico, fisiologico, biochimico e sierologico hanno indicato che il batterio era un tipico membro della specie *Pseudomonas syringae*. Ma le differenze riscontrate tra *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* e lo *Pseudomonas* isolato da nocciolo, così come la specificità dell'ospite,

hanno permesso di classificarlo come *Pseudomonas syringae* pv. *avellanae* (Psallidas, 1993). Contemporaneamente *Pseudomonas syringae* pv. *avellanae* fu individuato dapprima in un nocciuolo della provincia di Roma, impiantato con materiale di propagazione proveniente dal Viterbese, e successivamente in numerosi comuni della provincia di Viterbo (Scortichini, 1996).

I ceppi isolati in Grecia e in Italia sono stati studiati mediante profilo degli acidi grassi e delle proteine della parete cellulare, così come per la sequenza del 16S rRNA e la percentuale di similarità del DNA. Il confronto con le analisi di altri ceppi di *Pseudomonas* hanno indicato che i ceppi erano molto omogenei tra loro, anche se era stata riscontrata una differenza nel numero e nel peso molecolare di plasmidi tra i ceppi greci e quelli italiani, ma comunque il batterio che causava il cancro del nocciolo era distante da tutte le pathovar testate di *P. syringae* inclusa pv. *syringae*. Per questo motivo è stata proposta la riclassificazione di *P. syringae* pv. *avellanae* in *P. avellanae* (Janse *et al.*, 1996).

La malattia sembrava essere diffusa anche in altre regioni italiane ma studi recenti, effettuati mediante tecniche molecolari quali ARDRA, REP-PCR e analisi di proteine, hanno permesso di comprendere che in realtà la sintomatologia osservata presente nelle altre regioni quali Piemonte, Campania, Sicilia e Sardegna sarebbe ascrivibile ad un altro batterio *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (Scortichini *et al.*, 2000).

I saggi finora utilizzati per identificare ceppi virulenti di *P. avellanae* prevedono l'utilizzo di test biochimici, fisiologici e nutrizionali che richiedono però molto tempo e sono difficili da utilizzare come routine. Un metodo ancora oggi utilizzato per una veloce identificazione di *P. avellanae* prevede l'utilizzo della PCR con elementi ripetitivi (rep-PCR). Il profilo genomico di un ceppo noto di riferimento viene confrontato con quello ottenuto per i ceppi da identificare. In questo modo è stato possibile distinguere diverse popolazioni del patogeno in base alla loro origine geografica.

Sono stati costruiti anche dei primer specifici comparando la sequenza parziale del gene 16S rRNA del ceppo di *P. avellanae* depositato nella banca dati di EMBL (Janse *et al.*, 1996) con la sequenza codificante lo stesso gene di *P. syringae* pv. *syringae* depositata nella stessa banca dati. La zona del gene che mostrava più variabilità è stata scelta per costruire i primer specifici PAV 1 e PAV 22 (Scortichini *et al.*, 2001).

Sono stati utilizzati anche altri primer per la diagnosi di ceppi virulenti di *P. avellanae* disegnati sul gene che codifica per l'arpina. I primer WA e WC sono stati selezionati comparando la sequenza nucleotidica del gene *hrpW* di due ceppi noti di *P. avellanae*, di *P. syringae* pv *tomato* e di *P. s.* pv *syringae*. Mediante PCR si è ottenuto un amplificato su DNA genomico purificato sia da colture batteriche che da tessuto di corteccia di nocciolo.

1.11 *Erwinia* spp.

Negli stessi anni in cui *P. avellanae* era identificato come il patogeno responsabile del cancro del nocciolo nel nord della Grecia, una malattia dai sintomi simili a questa veniva identificata nel Viterbese. Il patogeno isolato fu classificato in base ai test di tipo colturale, fisiologico e biochimico come appartenente al gruppo delle “vere Erwinie” (Schroth *et al.*, 1980). In particolare le caratteristiche dell'isolato erano simili a quelle di *Erwinia amylovora* e *E. rubrifaciens* (Varvaro 1990). Fu notato infatti come i sintomi osservati sul nocciolo e la rapida morte delle branche affette da moria assomigliavano molto a quelli del “fuoco batterico” su pero causato da *E. amylovora*. L'agente batterico della moria potrebbe essere un ceppo di *E. amylovora* altamente specializzato sul nocciolo (Varvaro, 1990).

E. amylovora è un batterio gram negativo che appartiene alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*. Il genere *Erwinia* fu proposto da Winslow *et al.* (1917) per i batteri gram negativi, non formanti spore, peritrichi, fermentativi, bastoncellari, e che appartengono alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*. Inoltre il genere fu proposto per i batteri patogeni o saprofiti associati alle piante.

La struttura del genere *Erwinia* viene discussa da molto tempo usando sia dati fenotipici che genotipici. Per primo Dye (1968; 1969a; 1969b) classificò i membri del genere *Erwinia* in tre cluster sulla base del fenotipo patogenico:

- il gruppo carotovora, caratterizzato dalle specie che causano marciume del tessuto della pianta (ad es. *E. carotovora* subsp. *carotovora* e *E. crysanthemii*). Sebbene alcuni autori abbiano proposto che per questo gruppo dovrebbe essere designato il genere *Pectobacterium*, per distinguerlo dalle altre specie di *Erwinia* sia per le caratteristiche patogeniche che

biochimiche, questa divisione non è ancora da tutti ancora accettata (Brenner *et al.*, 1977).

- Il gruppo amylovora comprende invece quei patogeni che causano necrosi caratterizzate dalla formazione di cancri nelle loro specifiche piante ospiti e la posizione tassonomica di questo gruppo come gruppo delle “vere *Erwinia*” è stata raramente messa in discussione. Solo recentemente studi di ibridizzazione DNA-DNA e analisi biochimiche hanno permesso di comprendere che in realtà *E. amylovora* ha bassi livelli di omologia con le altre specie del gruppo amylovora e sono state quindi riclassificate in due generi separati: il genere *Erwinia* e il genere *Brenneria*. (Hauben *et al.*, 1998). Per quanto riguarda la sintomatologia, i generi *Erwinia* e *Brenneria* comprendono tutte le specie fitopatogene che causano necrosi insieme a *Erwinia rhapontici* e *Erwinia persicina*.

- Il gruppo herbicola è tassonomicamente più complesso. La maggior parte dei membri di questo gruppo produce un pigmento giallo e sono strettamente associati ad *Enterobacter agglomerans*. Recentemente questi ceppi sono stati inseriti in un nuovo genere, il genere *Pantoea* (Gavini *et al.*, 1989)

Il batterio isolato da nocciolo era un gram negativo, bastoncellare, con flagelli peritrichi, ossidasi negativo, anaerobio facoltativo, ureasi negativo, e formava acidi da arabinosio, ribosio, sorbitolo, saccarosio, ma non da cellobiosio, inositolo, ramnosio e xilosio. Queste caratteristiche biochimiche sono intermedie tra quelle di *Erwinia amylovora* ed *E. rubrifaciens* (Varvaro, 1990).

1.12 Scopo del lavoro

La “moria” del nocciolo è una delle malattie più gravi tra quelle che colpiscono il nocciolo, e, nella provincia di Viterbo, ha assunto negli ultimi anni un carattere endemico.

L’obiettivo di questo lavoro è quello di identificare, mediante metodi molecolari, i batteri isolati da piante di nocciolo sintomatiche in diversi comuni della provincia di Viterbo, e quelli isolati dall’interno/esterno dell’insetto *Anisandrus dispar*, supposto vettore del patogeno. Una volta definite le relazioni genetiche tra i batteri isolati e quelli potenzialmente coinvolti nella “moria”, un ulteriore obiettivo è quello di studiare le loro relazioni intrageneriche e intergeneriche, confrontando i marcatori molecolari ottenuti da due diverse metodiche: analisi delle mutazioni del gene ribosomiale 16S e la tecnica AFLP.

Un altro obiettivo riguarda il grado di associazione mutualistica tra il putativo patogeno e l’insetto specificamente alla funzione di vettore da parte di quest’ultimo, confrontando i dati molecolari che scaturiscono dall’analisi dei marcatori tra i batteri isolati sulla pianta e quelli isolati dall’insetto.

Un altro obiettivo oggetto del lavoro di ricerca riguarda la possibilità di sviluppare marcatori SCAR a partire dai frammenti AFLP, al fine di ottenere dei primer specifici per la caratterizzazione di specie e di ceppi batterici. La tecnica AFLP e la tecnica SCAR permetterebbero quindi di studiare le relazioni genetiche tra ceppi di *P. avellanae* isolati in Grecia e quelli isolati in provincia di Viterbo per creare una caratterizzazione a livello intraspecifico.

Infine, la possibilità di disporre di primer altamente specifici e discriminanti per una singola specie batterica permetterebbe una rapida individuazione del putativo patogeno non solo in piante sintomatiche ma anche in quelle asintomatiche accelerando così la capacità diagnostica.

CAPITOLO 2 MATERIALI E METODI GENERALI

2.1 *Isolati batterici*

Gli isolati batterici (riportati in Tabella 2-I) indagati in questo studio, riguardano sia batteri isolati da piante di nocciolo sintomatiche in vari comuni della provincia di Viterbo sia batteri acquistati presso due diverse collezioni: l'American Type Culture Collection (ATCC) e la National Collection of Plant Pathogenic Bacteria (NCPPB). Oltre a questi, sono stati oggetto di indagine in questo lavoro altri batteri ottenuti dall'insetto Scolitide *A.dispar* catturato nei noccioletti sperimentali durante il 2004 e il 2005.

Specie	Ceppo	Provenienza*	Ospite, anno e luogo di isolamento	Altra denominazione
<i>Brenneria quercina</i>	1852	NCPPB	<i>Quercus</i> sp., USA, 1964	ATCC 29281, ICMP 1845
<i>Brenneria rubrifaciens</i>	2021	NCPPB	<i>Juglans regia</i> , USA, 1965	ATCC 29292
<i>Brenneria nigrifluens</i>	29275	ATCC	Persian walnut, Sacramento Valley, CA	
<i>Brenneria alni</i>	3833	NCPPB	<i>Alnus glutinosa</i> , Italy, 1992	
<i>Erwinia amylovora</i>	1734	NCPPB	<i>Pyrus communis</i> , IRAN, 1965	
<i>Pseudomonas avellanae</i>	3872	NCPPB	<i>Corylus avellana</i> , Italy, 1993	ISPAVE-B-011
<i>Pseudomonas avellanae</i>	3489	NCPPB	<i>Corylus avellana</i> , Greece, 1976	F110
<i>Pseudomonas avellanae</i>	3490	NCPPB	<i>Corylus avellana</i> , Greece, 1976	F135
<i>Pseudomonas avellanae</i>	3491	NCPPB	<i>Corylus avellana</i> , Greece, 1976	F150
<i>Pseudomonas avellanae</i>	4225	NCPPB	<i>Corylus avellana</i> , Greece, 1984	BPIC 703
<i>Pseudomonas avellanae</i>	4226	NCPPB	<i>Corylus avellana</i> , Greece, 1984	BPIC 714
<i>Pseudomonas avellanae</i>	636	BPIC	<i>Corylus avellana</i> , Greece, 1984	
Batteri associati alla moria del nocciolo	153, 29, 151, 27, 150, 28b		<i>Corylus avellana</i> , Soriano (VT), 1998	
Batteri associati alla moria del nocciolo	8b, 19b, 148, 31, 19a, 7b, 7a		<i>Corylus avellana</i> , Capranica (VT), 1998	
Batteri associati alla moria del nocciolo	157, 30, 156		<i>Corylus avellana</i> , Vetralla, (VT) 1998	
Batteri associati alla moria del nocciolo	74		<i>Corylus avellana</i> , Roma, 1998	
Batteri associati alla moria del nocciolo	F29		<i>Corylus avellana</i> , Vico Matrino (VT), 2004	
Batteri isolati dall'insetto <i>A. dispar</i>	22.03.04MEXTA, 5.04.04MEXTA, 5.04.04 MINTA , 5.4.04 VSINTB, 26.04.04 MINTA, 26.04.04MEXTC, 7.05.04 VSINTA 10.05.04 VMINTA			

Tabella 2-I. Ceppi utilizzati e numero di accessione *NCPPB, National Collection Plant Pathogenic Bacteria, York UK ; ATCC, American Type Culture Collection, Rockville; BPIC, Benaki Fitopatological Institute.

2.2 Substrati per la crescita

I substrati generalmente utilizzati per isolare specie appartenenti al genere *Pseudomonas* sono il terreno B di King et al. (KB) e l'ANS. Infatti su tali substrati è possibile evidenziare, dopo 48 ore, la presenza di colonie fluorescenti (su KB) e di colonie levaniiformi (su ANS). Per conservare le colonie sono stati utilizzati il substrato ANG per le *Pseudomonadaceae* e YDC per le *Enterobacteriaceae*. Per l'estrazione di DNA è stato utilizzato il substrato Luria-Bertani (LB) (Sambrook *et al.*, 1989). La composizione per litro per ogni substrato e la modalità di preparazione sono state le seguenti:

- **ANS** (substrato per la crescita):

Nutrient Broth (Difco)	8 g
Saccarosio	50 g
Agar tecnico	18 g
Acqua distillata	1000 ml

La miscela dopo essere stata sciolta sull'agitatore magnetico con piastra riscaldante è stata sterilizzata in autoclave a 121° C per 20 minuti. Successivamente il substrato è stato posto in un bagno termostato fino a raggiungere una temperatura di 50° C. Infine, in condizioni di sterilità, è stato versato in piastre Petri da 10 cm di diametro fino a formare uno strato di 3-4 mm. Le piastre, avvenuta la solidificazione, sono state conservate a temperatura ambiente.

- **ANG** (substrato di crescita e di conservazione):

Nutrient Broth (Difco)	8 g
Glicerina	20 g
Agar tecnico	18 g
Acqua distillata	1000 ml

Per la crescita, il substrato è stato preparato con le stesse modalità descritte per l'ANS.

Per la conservazione delle colonie batteriche, il substrato, dopo essere stato sciolto a caldo, è stato distribuito in tubi da batteriologia in ragione di 5 ml per tubo o in vials in ragione di 1.5 ml ciascuna. Successivamente i tubi sono stati sterilizzati in autoclave a 121° C per 15 minuti e, infine, lasciati raffreddare in posizione inclinata per permettere la solidificazione del substrato a “becco di clarino”.

- **YDC** (substrato di conservazione per le *Enterobacteriaceae*):

Destrosio	20 g
Estratto di Lievito	10 g
CaCO ₃	20 g
Agar tecnico	12 g
Acqua distillata	1000 ml

Il substrato è stato preparato con le stesse modalità descritte per l'ANG in tubi. Per evitare la precipitazione del carbonato di calcio i tubi sterilizzati, contenenti il substrato, sono stati posti nel bagnetto termostato fino a raggiungere la temperatura di 46° C, agitati nel vortex e rapidamente posti inclinati, per ottenere il “becco di clarino”, in una vaschetta contenente ghiaccio. Il substrato è stato conservato a 4° C in frigorifero.

- **LB** (Brodo di crescita e di conservazione a – 80° C):

NaCl	10 g
Tryptone	10 g
Estratto di lievito	5 g
Acqua distillata	1000 ml

Il substrato liquido è stato preparato con le stesse modalità utilizzate nella preparazione di ANG in tubi.

- **KB** (substrato per evidenziare la produzione di pigmenti fluorescenti):

Glicerina	10 g
Bacto triptone	10 g
Proteose peptone	10 g
Fosfato potassio diidrogeno	1,5 g
Magnesio solfato	1,5 g
Agar	15 g
Agar tecnico N. 3 Oxoid	10 g
Acqua distillata	1000 ml

Il substrato è stato preparato con le stesse modalità descritte per l'ANS

2.3 Conservazione dei batteri a -80°C

Al fine di conservare per un lungo periodo i ceppi batterici più caratteristici si è scelto di congelarli a -80° C. Si è proceduto preparando due soluzioni (Schaad, 1988).

Nella soluzione n° 1 sono stati miscelati 7 ml di LB (par.II.2.2.1) e 3 ml di glicerolo sterili.

Nella soluzione n° 2, costituita da LB sterile in tubi da batteriologia, sono stati fatti crescere i batteri per una notte a 28° C tenendoli in agitazione. Infine sono stati miscelati, all'interno di eppendorf, 0.5 ml della soluzione n°1 con 0.5 ml della soluzione n° 2 ed il campione è stato riposto rapidamente nel congelatore a -80° C.

2.4 Estrazione rapida del DNA

Una rapida estrazione di DNA da cultura batterica è stata ottenuta prendendo una piccola quantità di colonia con un'ansa sterile da una piastra ANG dopo 48h a 27°C e risospendendo il materiale cellulare in 100 µl di acqua sterile. I tubi poi sono stati messi in un amplificatore per PCR a 100° C per 10 minuti e centrifugati per 2 minuti alla massima velocità in una microcentrifuga. Infine 10 µl del supernatante sono stati utilizzati come template in una normale reazione PCR.

2.5 Estrazione del DNA con il kit Quiagen

Per l'estrazione del DNA genomico una ansata di colonia è stata messa in un tubo sterile contenente 10 ml di LB liquido e fatta crescere in un termostato a 26°C in agitazione a 100 rpm per tutta la notte. Dopo 24-48 h di crescita è stata misurata l'assorbanza mediante un turbidimetro (Spectronic 21) a 600 nm finché si è raggiunta la concentrazione massima di 2×10^9 . La cultura cellulare è stata quindi trasferita in un eppendorf da 1,5 ml e centrifugata per 10 minuti a 5000 g. I successivi passaggi sono stati effettuati utilizzando il DNeasy Tissue kit della Quiagen seguendo le istruzioni riportate dalla ditta con l'aggiunta di piccole modifiche.

- Il pellet si risospende in 180 µl di buffer ATL;
- si aggiungono 20 µl di proteinasi K e i campioni si mettono ad incubare a 55°C in agitazione per 1 ora;
- si aggiungono 4µl di RN-ase A (soluzione stock 100 mg/ml) e i campioni si agitano con un vortex per 15 sec;
- si aggiungono 200 µl di buffer AL e immediatamente i tubi si agitano con un vortex per 5 secondi;
- i tubi si chiudono con parafilm e si mettono a incubare nel Termoblock a 70°C per 10 minuti;
- si aggiungono 200 µl di etanolo e si agitano i tubi in vortex fino ad ottenere una soluzione omogenea;
- 600 µl della soluzione vengono caricati su una colonnina montata su un tubo da 2 ml;
- si centrifuga a 6000g per 1 min. e si sostituisce il tubo con uno pulito;
- si aggiungono 500 µl di buffer AW1 e si centrifuga a 6000g per 1 min. Si scarica il tubo;
- si aggiungono 500 µl di buffer AW2 e si centrifuga a 18000g per 3 min. Si scarica il tubo;
- le colonnine vengono montate su un tubo pulito;
- il DNA è stato eluito due volte in 200 µl di TE buffer;

- il DNA ottenuto è stato poi quantificato diluendo 20 µl della miscela in 180 µl di acqua sterile (diluizione 1/10) e leggendo l'assorbanza a 260 nm con lo spettrofotometro (PERKIN ELMER).

La concentrazione del DNA in ng/µl viene calcolata con questa formula:

$$50 \text{ ng/}\mu\text{l} \times \text{Assorbanza}_{260} \times \text{fattore di diluizione}$$

2.6 POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

Da un sondaggio di fine secolo, effettuato su un campione di ricercatori, la **PCR** (Polymerase Chain Reaction) è stata indicata come una delle scoperte più importanti del 900. La PCR infatti, non solo permette l'amplificazione *in vitro* di frammenti di DNA senza il trasferimento in cellule viventi, ma dal 1987 (Mullis, 1983) sono stati innumerevoli i campi e molteplici le applicazioni in cui è stata introdotta. I vantaggi, che hanno reso la PCR una tecnica tanto diffusa, sono sia di tipo tecnico, sia per quanto riguarda la natura dei campioni stessi. Le altre tecniche di amplificazione richiedono l'utilizzo di vettori (plasmidi, virus e cosmidi) per trasferire il DNA da amplificare in cellule viventi dove saranno clonate. Tutto ciò si traduce in tempi lunghi e costi elevati. Mentre la PCR richiede esclusivamente la conoscenza delle sequenze adiacenti al frammento da amplificare e un enzima resistente alla temperatura: la Taq polimerasi.

La PCR è un metodo attraverso cui una sequenza di acido nucleico può essere amplificata esponenzialmente *in vitro*. È necessario che le estremità della sequenza da amplificare siano conosciute per poter sintetizzare degli oligonucleotidi che saranno ibridizzati ad essa, e che una piccola quantità della sequenza sia disponibile per dare inizio alla reazione. Il prodotto sarà una molecola di DNA a doppio filamento con estremità corrispondenti a quelle 5' degli oligomeri utilizzati.

2.6.1 Un tipico ciclo di PCR

Consiste di tre passaggi fondamentali (Sambrook *et al.*, 1989):

1. Denaturazione : il DNA a doppio filamento viene denaturato ad una temperatura che è determinata in parte dal contenuto in G+C. Più alta sarà la proporzione G+C, più

alta sarà la temperatura richiesta per separare i filamenti di DNA. Nelle PCR catalizzate dalla Taq DNA polymerase, la denaturazione è effettuata a 94-95°C, che è la più alta temperatura che l'enzima può tollerare per 30 o più cicli senza essere danneggiato. Spesso nel primo ciclo di PCR la denaturazione è portata fino a 5 minuti per aumentare la probabilità che anche le molecole più lunghe siano denaturate completamente.

2. Appaiamento (annealing) dei primer al DNA. La temperatura di annealing è di solito scelta 3-5°C più bassa della temperatura di melting alla quale i primer si dissociano dal loro template. Ci sono molte equazioni disponibili per calcolare la temperatura di melting. Una equazione molto utilizzata è conosciuta come “la regola di Wallace”(Thein e Wallace, 1986):

$$T_m \text{ in } ^\circ\text{C} = 2 (A+T) + 4 (G+C)$$

Dove (A+T) è la somma dei residui di adenina e timina e (G+C) è la somma dei residui di citosina e guanina.

3. Estensione dei primer oligonucleotidici è condotta alla temperatura ottimale per la sintesi di DNA catalizzata dalla Taq che è 72° C. Di solito l'estensione è condotta per 1 minuto per ogni 1000 pb del prodotto.

Il numero di cicli richiesto per l'amplificazione dipende dal numero di copie di DNA template presente all'inizio della reazione e dall'efficienza dell'estensione dei primer e dell'amplificazione.

Almeno 25 cicli sono di solito necessari per raggiungere livelli accettabili di amplificazione del template. Al termine di n cicli, il miscuglio di reazione contiene un numero massimo teorico di molecole di DNA a doppia elica pari a 2^n . Tali molecole sono le copie della sequenza di DNA compresa tra i due primers.

2.7 PCR con primer specifici

Al fine di confermare la presenza del batterio *Pseudomonas avellanae* sui campioni isolati da piante di nocciolo sintomatiche, già caratterizzate per la morfologia e per il profilo degli acidi grassi, e per identificare velocemente la presenza dello stesso batterio internamente e/o esternamente all'insetto *A. dispar* sono stati utilizzati dei primer specifici disegnati sul gene *hrpW* (Loreti *et al.*, 2001; Loreti e Galleli, 2002).

WA	5'-TCCACAGGACGCCAGCAAGA-3'
WC	5'-TGCGGTGTTACGCCACCATC-3'

Il cluster *hrp* è necessario ai batteri, patogeni per le piante, per produrre sintomi su un ospite suscettibile e per indurre la risposta ipersensibile negli ospiti resistenti.

Il DNA è stato estratto dalle colonie batteriche come riportato nell'articolo Loreti e Galleli 2002..

La reazione PCR è stata eseguita in una miscela da 50µl contenente 1x PCR buffer, 0,2mM dNTPs, 2mM MgCl₂, 0,5mM di ciascun primer, 1U di Taq polimerasi e 2µl del DNA estratto.

La reazione PCR consiste in una iniziale denaturazione (94°C, 3 min) seguita da 30 cicli a 94°C (1 min), 62°C (1 min), 72°C (1,5 min) e uno step finale a 72°C per 5 min.

10 µl del prodotto amplificato sono stati analizzati su un gel d'agarosio all'1%, corsi nel tampone TBE marcato con etidio bromuro e fotografato sotto un illuminatore a UV.

CAPITOLO 3 ANALISI 16S DEGLI ISOLATI BATTERICI

3.1 La tecnica del 16S

A partire dal 1980 è stato sviluppato un nuovo metodo per l'identificazione dei batteri. Nei laboratori di Woese ed collaboratori, fu dimostrato che attraverso l'analisi di porzioni stabili del genoma potevano essere determinate le relazioni filogenetiche tra batteri o altre forme di vita (Woese *et al.* 1985; Woese, 1987). Tra le porzioni genetiche candidate erano incluse i geni che codificano per l'rRNA ribosomale 5S, 16S (anche chiamati le subunità piccole), il 23S e gli spazi compresi tra queste regioni geniche.

La porzione di DNA più comunemente usata per scopi tassonomici è il gene 16S rRNA (Bottger, 1989; Garrity e Holt., 2001; Harmsen e Karch., 2004). Il gene 16S rRNA è anche chiamato 16S rDNA, e i due termini sono utilizzati in modo intercambiabile. La sequenza di questo gene è altamente conservata perché ha un ruolo molto importante per la funzione cellulare. Mutazioni in alcuni geni sono tollerate, poiché le ripercussioni sulla struttura della molecola codificata sono compatibili con la sua esistenza e la funzione ove agiscono, al contrario di quanto potrebbe accadere con l'rRNA, ad esempio: se un batterio non possiede il gene per produrre l'enzima necessario per utilizzare il lattosio, esso può in alternativa utilizzare zuccheri o proteine come risorsa di energia (Clarridge, 2004). Così pochi altri geni sono così conservati come quelli del 16S rRNA.

La dimensione del gene è di 1550 pb ed è costituito sia da regioni conservate che variabili. Per gli studi di tassonomia sono sintetizzati primer universali sulle regioni conservate, presenti all'inizio o alla fine del gene, che permettono di amplificare una regione comprendente quelle variabili, impiegate invece negli studi di tassonomia comparativa (Chen *et al.*, 1989; Relman, 1999).

La sequenza del 16S rRNA è stata determinata per un gran numero di specie. GenBank, la più grande banca dati di sequenze nucleotidiche, contiene più di 20 milioni di sequenze depositate, delle quali più di 90.000 sono degli orologi del gene 16S rRNA. Sebbene la maggior parte di queste sequenze hanno una lunghezza di circa 500 o 1500 pb, possono essere presenti anche sequenze di lunghezza differente. E' quindi

importante considerare quando è necessario sequenziare l'intero gene o quando sequenze più piccole possono dare informazioni comparabili. Spesso sequenziare l'intera regione di 1500 pb è necessario per distinguere tra particolari taxa o ceppi (Sacchi *et al.*, 2002a; 2002b), oppure per descrivere nuove specie. Invece per la maggior parte dei batteri isolati, le 500 pb iniziali sono sufficienti per l'identificazione poiché questa regione è quella maggiormente eterologa che possiede più differenze tra i ceppi.

Molte altre regioni genomiche sono state utilizzate per studiare le relazioni filogenetiche tra i batteri, ma quando l'obiettivo è quello di identificare un organismo sconosciuto, l'analisi della sequenza del gene 16S rRNA è un metodo eccellente ed ampiamente impiegato. Infatti nella nuova edizione del "Bergey's manual" di Batteriologia Sistemica, il più usato e autorevole manuale di tassonomia batterica, la sistematica è stata organizzata utilizzando la sequenza del gene 16S rRNA come punto centrale.

Ma come è determinata la sequenza del gene 16S rRNA? Storicamente esistono molti metodi per determinare la sequenza del DNA. Il DNA batterico genomico viene per prima cosa estratto dalle cellule utilizzando un metodo standard (Sambrook *et al.*, 1989) oppure un kit commerciale. Il DNA è poi utilizzato come template in PCR per amplificare un segmento di 500 o 1500 pb della sequenza del gene 16S rRNA. I primer utilizzati sono complementari alle regioni conservate del gene così che possa essere amplificata la stessa regione in qualsiasi batterio. I prodotti PCR sono quindi purificati in modo tale da rimuovere gli eccessi di primer e nucleotidi; per tale attività sono oggi disponibili parecchi kit commerciali (per es. QiaQuick PCR purification kit della Quiagen e Microcon-100 Microconcentrator columns della Millipore).

Il successivo step è un processo chiamato sequenziamento. Questo è simile alla reazione di amplificazione enzimatica in quanto utilizza DNA come template, ma differisce da essa perchè nessun nuovo template si forma (lo stesso template è riutilizzato per il numero di cicli programmato, di solito 25 cicli) ed il prodotto che si ottiene è una miscela di DNA di varia lunghezza. Nella miscela di reazione, inoltre, sono aggiunte separatamente delle basi marcate, chiamate terminatori fluorescenti, insieme a basi non marcate, che, quando incorporate, nel frammento nascente, in corrispondenza delle basi complementari, presenti nel template, terminano la reazione. Così vengono prodotti frammenti di ogni lunghezza. Poiché ognuno dei quattro

terminatori fluorescenti assorbe ad una differente lunghezza d'onda, la base terminale di ogni frammento può essere determinata da un fluorometro. I prodotti sono poi purificati per rimuovere i terminatori fluorescenti che non si sono legati e la lunghezza di ogni frammento è determinata utilizzando l'elettroforesi capillare (ad es. l'analizzatore genetico ABIPRISM 310 automatic sequencer della Applied Biosystem Inc., Foster City, California con 1 capillare). Il risultato è un elettroferogramma, un tracciato della misura dei frammenti separati quando escono dalla colonna nel quale ogni base è rappresentata da un diverso colore.

Le sequenze dei DNA generati sono di solito assemblate allineando le sequenze del forward e del reverse. Le sequenze risultanti dall'analisi dell'allineamento sono poi comparate con un database utilizzando specifici software di analisi. I database che contengono il maggior numero di sequenze del gene 16S rRNA depositate e che possono essere consultati attraverso il World Wide Web sono: GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), the Ribosomal Database Project (RDP-II) (<http://rdp.cme.msu.edu/html/>), the Ribosomal Database Project European Molecular Biology Laboratory (<http://www.ebi.ac.uk/embl/>), Smart Gene IDNS (<http://www.smartgene.ch>), and Ribosomal Differentiation of Medical Microorganisms (RIDOM) (<http://www.ridom.com/>).

Una volta ottenute le sequenze è possibile fare un'analisi di confronto tra lo stesso gene in diverse specie costruendo un dendrogramma. I metodi generalmente utilizzati per costruire un dendrogramma sono il metodo NJ (neighbor-joining), l'UPGMA (unweighted pair group method) e il WPGMA (weighted pair group method) (Saitou e Nei, 1987; Waterman, 1995). Questi metodi sono comparabili e i principali raggruppamenti ottenuti sono preservati se gli organismi sono strettamente correlati.

Il programma CLUSTALW allinea le sequenze e costruisce un albero filogenetico nella forma di un filogramma o di un cladogramma. Un filogramma è un albero che si assume essere una stima di una filogenia. La lunghezza delle branche è proporzionale alla quantità di cambiamenti evolutivi dedotti. Un cladogramma è un albero che si assume essere una stima di una filogenia quando i rami (le branche) sono di uguale lunghezza. Quindi i cladogrammi mostrano le origini comuni, ma non indicano la quantità di tempo evolutivo di separazione dei taxa.

3.2 MATERIALI E METODI

3.2.1 Primer 16S

Per l'amplificazione del 16S rDNA batterico sono stati utilizzati i seguenti primer:

Primer	Sequenza	Posizione sul gene 16S di <i>E.coli</i>
6F	5'-GGAGAGTTAGATCTTGGCTCAG-3'	+6-28
1510R	5'-GTGCTGCAGGGTTACCTTGTTACGACT-3'	-1510-1483

Tabella 3-I: Nella tabella sono riportati i nomi dei primer 16S, la loro sequenza, e la posizione sul gene 16S di *E. coli*.

I due primer sono universali in quanto sono stati disegnati per amplificare tutte le sequenze 16S dei batteri. I primer amplificano un segmento di 1500 pb del gene 16S rRNA di *Escherichia coli*.

Le posizioni dei primer universali batterici Forward e Reverse sono indicati sulla sequenza del gene 16S dell' RNA ribosomale di *E. coli* (Fig. 3-1). Gli allineamenti tra le sequenze dei primer e il gene 16S rRNA di *E. coli* sono indicati con (*).

16S rRNA gene

1 aaattgaaga gtttgatcat ggctcagatt gaacgctggc ggcaggccta acacatgcaa
 * *** *** ***** *

Forward: 5' - ggaga gtttagatctt ggctcag -3'--->

61 gtcgaacggt aacaggaaga agcttgctct ttgctgacga gtggcggacg ggtgagtaat
 121 gtctgggaaa ctgcctgatg gagggggata actactggaa acggtagcta ataccgcata
 181 acgtcgcaag accaaagagg gggaccttcg ggcctcttgc catcggtatgt gccagatgg
 241 gattagctag taggtgggtt aacggctcac ctaggcgacg atccctagct ggtctgagag
 301 gatgaccagc cacactggaa ctgagacacg gtccagactc ctacgggagg cagcagtggg
 361 gaatattgca caatgggcgc aagcctgatg cagccatgcc gcgtgtatga agaaggcctt
 421 cgggttgtaa agtactttca gcggggagga agggagtaaa gttaatacct ttgctcattg
 481 acgttaccog cagaagaagc accggctaac tccgtgccag cagccgcggt aatacggagg
 541 gtgcaagcgt taatcggaat tactgggcgt aaagcgcacg caggcggttt gttaagtcag
 601 atgtgaaatc cccgggctca acctgggaac tgcactctgat actggcaagc ttgagtctcg
 661 tagagggggg tagaattcca ggtgtagcgg tgaaatgcgt agagatctgg aggaataaccg
 721 gtggcgaagg cggccccctg gacgaagact gacgctcagg tgcgaaagcg tggggagcaa
 781 acaggattag ataccctggt agtccacgcc gtaaacgatg tcgacttgga ggttggtccc
 841 ttgaggcgtg gcttccggag ctaacgcgtt aagtcgaccg cctggggagt acggccgcaa
 901 gggttaaaact caaatgaatt gacgggggccc cgcacaagcg gtggagcatg tgggttaatt
 961 cgatgcaacg cgaagaacct tacctggtct tgacatccac ggaagttttc agagatgaga
 1021 atgtgccttc gggaaccgtg agacaggtgc tgcattgctg tcgtcagctc gtgttgtaaa
 1081 atgttggtt aagtcgccca acgagcgcaa cccttatcct ttgttgccag cgggccggcc
 1141 gggaactcaa aggagactgc cagtgataaa ctggaggaag gtggggatga cgtcaagtca
 1201 tcatggccct tacgaccagg gctacacacg tgctacaatg gcgcatacaa agagaagcga
 1261 cctcgcgaga gcaagcggac ctcataaagt gcgtcgtagt ccgatttga gtctgcaact
 1321 cgactccatg aagtcggaat cgctagtaat cgtggatcag aatgccacgg tgaatacgtt
 1381 cccgggcctt gtacacaccg cccgtcacac catgggagtg ggttgcaaaa gaagtaggta
 1441 gcttaacctt cgggagggcg cttaccactt tgtgattcat gactggggtg aagtcgtaac

<---- reverse 3'-tcagcattg

1501 aaggtaacgg taggggaacc tgcggttgga tcacctcctt a
 ***** ** * **
 ttccattggg acgtcgtg-5'

Figura 3-2. Sequenza del gene 16S del rDNA di *E. coli*

3.2.2 PCR CON PRIMER 16s

In un volume finale di 50 µl della reazione di amplificazione, 5 µl di DNA genomico sono stati amplificati con i primer 6F e 1510R alla concentrazione di 0,5 µM ciascuno. La concentrazione finale dei reagenti PCR è stata la seguente: 0.2 mM di ciascun deossiribonucleotide (dNTPs), 1X PCR buffer (Pharmacia Biotech, Sweden), 2 mM MgCl₂, e 1 unità di Taq DNA polimerasi (Pharmacia Biotech, Sweden).

La PCR è stata effettuata con l'amplificatore GeneAmp® PCR system 2400 (Perkin Elmer-Applied Biosystems, Warrington, UK) programmato come segue: uno step di denaturazione iniziale a 94°C per due minuti, seguito da 30 cicli ognuno a 94°C per 1 minuto, 55°C per 1 minuto, 72°C per 1.5 minuti e uno step di estensione finale a 72°C per 10 minuti. Tutti i prodotti dell'amplificazione sono stati visualizzati su un gel all'1% di agarosio (Agarose MP, Roche) utilizzando il tampone TBE contenente 0.1 µg/ml di bromuro di etidio. La corsa elettroforetica è avvenuta alle condizioni di 60 Volt, ed il gel è stato esposto sotto un transilluminatore UV per visualizzare il DNA. L'acquisizione dell'immagine è stata ottenuta con il programma KODAK 1D con una fotocamera digitale DC 290.

La purificazione del DNA del frammento amplificato, dai componenti della reazione PCR, è avvenuta utilizzando il Montage PCR centrifugal filter devices (Millipore). Sono stati caricati 350 µl di acqua distillata sterile all'interno del filtro montato su una eppendorf fornita dal kit e sono stati aggiunti 50 µl di reazione PCR (il volume finale deve essere 400 µl). I tubi sono stati centrifugati a 1000 g per 15 minuti, il filtro è stato rimosso e montato su un eppendorf sterile. Sono stati aggiunti 20 µl di acqua distillata sterile, il filtro è stato invertito e centrifugato a 1000 g per 2 minuti. Per verificare che il DNA sia stato purificato sono stati caricati 5 µl di prodotto PCR in un gel all'1% di agarosio.

3.2.3 Sequenziamento

I campioni isolati sono stati sequenziati e la reazione è stata effettuata utilizzando l'ABI Prism BigDye Terminator Cycle sequencing Ready reaction kit (Applied Biosystem Inc., Foster City, California) con un ABI Prism 310 automatic sequencer

(Applied Biosystem Inc., Foster City, California) utilizzando i primer 6 F e 1510 R ed un primer interno alla regione per il sequenziamento completo del gene. La sequenza del primer interno (6F515: 5'-GTGCCAGCAGCCGCGG- 3') è stata ottenuta allineando le sequenze del 16S delle seguenti specie: *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Pseudomonas avellanae*, *Erwinia amylovora*, *Brenneria salicis*, *Brenneria rubrifaciens*, *Brenneria nigrifluens*, *Xanthomonas campestris* ed *Escherichia coli*. Tutte le sequenze sono state prelevate dalla banca dati di EMBL ed allineate con il programma CLUSTALW, scegliendo per la costruzione del primer interno la regione più conservata. La posizione del primer sulla sequenza del gene 16S di *E. coli* risulta localizzata tra la base 515 e 531.

Le sequenze sono state esportate dal formato chromas al formato FASTA e copiate in un documento word. Le sequenze complete del 16S rDNA sono state ottenute per sovrapposizione delle sequenze realizzate con il primer forward e con il reverse e con il primer interno. Le sequenze così ottenute sono state inserite nel database di GenBank (<http://www.ebi.ac.uk/fasta3/>) e con il programma di ricerca FASTA è stata ricercata l'omologia di sequenza nei procarioti.

3.2.4 Dendrogramma

L'allineamento di tutte le sequenze è stato effettuato con il programma ClustalW <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>. (Higgins e Sharp., 1988), e gli allineamenti sono stati corretti a mano. Il programma consente anche di produrre un albero filogenetico e per il suo ottenimento è sufficiente introdurre l'allineamento delle sequenze in un formato standard e scegliere una delle tre opzioni: NJ, Pyhlip or Dist. Per ottenere l'albero filogenetico è stato utilizzato il programma PHYLIP (Felsenstein, 1993).

3.3 RISULTATI

3.3.1 Identificazione dei batteri isolati da materiale sintomatico

L'analisi delle sequenze del 16S rDNA è un metodo molto utilizzato per studiare le posizioni tassonomiche dei microrganismi, ed in questo studio è stato impiegato per un iniziale screening dei batteri. Con questo tipo di analisi è stato possibile selezionare, tra i microrganismi isolati, quelli putativamente coinvolti nella “moria” del nocciolo, specie appartenenti al genere *Brenneria* e *Pseudomonas*.

Numerosi batteri, isolati nel 1998 da piante di nocciolo sintomatiche in diversi comuni della provincia di Viterbo, erano stati già saggiati per le loro caratteristiche morfologiche su terreno ANS, per il profilo nutrizionale e poi per il profilo degli acidi grassi. Pertanto l'analisi della sequenza del 16S è stata impiegata per la conferma della genotipizzazione ottenuta con questi metodi.

Tra i vari isolati sono stati scelti dieci batteri che avevano mostrato caratteristiche simili a *P. avellanae* e per confermarne l'identità, il DNA estratto da essi è stato amplificato con i primer 16S ed il frammento ottenuto è stato sequenziato. Per le sequenze ottenute, tramite EMBL, è stata condotta l'omologia con altre specie (Tab.3-III).

NOME DELI'ISOLATO BATTERICO	PERCENTUALE DI SIMILARITA' CON ANALISI ACIDI GRASSI	PERCENTUALE DI SIMILARITA' CON ANALISI DI SEQUENZA DEL 16s
153C	88,3 <i>P.avellanae</i>	99,3 <i>P.avellanae</i>
29C	87,0 <i>P.avellanae</i>	99,3 <i>P.avellanae</i>
74C	86,4 <i>P.avellanae</i>	99,3 <i>P.avellanae</i>
8bC	85,6 <i>P.avellanae</i>	99,3 <i>P.avellanae</i>
19bC	85,2 <i>P.avellanae</i>	99,3 <i>P.avellanae</i>
7bC	91,8 <i>P.syringae</i>	99,3 <i>P.avellanae</i>
157C	70,1 <i>P.avellanae</i>	99,3 <i>P.avellanae</i>
148C	80,9 <i>P.avellanae</i>	99,3 <i>P.avellanae</i>
151C	79,1 <i>P.avellanae</i>	99,3 <i>P.avellanae</i>
19aC	73,2 <i>P.avellanae</i>	99,3 <i>P.avellanae</i>

Tabella 3.2-III : Nella tabella sono riportati per ogni isolato i risultati dell'analisi del profilo degli acidi grassi e delle sequenze del 16S.

Nella tabella è riportato il confronto tra i risultati ottenuti dall'analisi del profilo degli acidi grassi e quelli ottenuti dall'analisi delle sequenze del gene 16S. Solo per l'isolato 7bC l'analisi del profilo degli acidi grassi non sembra confermare l'analisi molecolare, anche se *P. syringae* ha un'alta identità di sequenza con il gene 16S di *P. avellanae*.

Successivamente, sempre con la stessa analisi molecolare, sono stati testati altri dieci batteri che secondo l'analisi morfologica appartenerebbero alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*. L'analisi delle sequenze ha evidenziato che di questi sei avevano più del 95% di identità con *Pantoea agglomerans*, un batterio non patogeno. Il risultato più interessante è scaturito dall'analisi di quattro batteri, isolati da piante di nocciolo sintomatiche, isolati nel comune di Vico Matrino nel 2004, e denominati Fe28, Fe29, Fe30, Fe31. Le sequenze hanno evidenziato la completa identità di sequenza tra i quattro, trattandosi quindi di un unico ceppo, ed in seguito a questo denominato FE29, e mostrante il 98% di identità di sequenza con il 16S di *Erwinia amylovora* (Fig. 3-2), accostandolo così all'*Erwinia* gruppo *amylovora* isolato nel Viterbese negli anni '80.

>>EM_PRO:AF140341 AF140341.1 Erwinia amylovora strain BC (1480 nt)
 initn: 4619 initl: 4619 opt: 7041 Z-score: 4870.9 bits: 913.9 E():
 banded Smith-Waterman score: 7041; 98.149% identity (98.217%
 ungapped) in 1459 nt overlap (4-1462:3-1460)

```

          10      20      30      40      50      60
Sequen TAGACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGTAGCACAGAGAGCTTGCTCT
      :
EM_PRO  GAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGTAGCACAGAGAGCTTGCTCT
          10      20      30      40      50

```

```

          70      80      90     100     110     120
Sequen CGGGTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCCCGATGGAGGGGGATA
      :
EM_PRO  TGGGTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCCCGATGGAGGGGGATA
        60      70      80      90     100     110

```

```

          130     140     150     160     170     180
Sequen ACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCTACGGACCAAAGTGGGGGACCTTCG
      :
EM_PRO  ACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCTACGGACCAAAGTGGGGGACCTTCG
        120     130     140     150     160     170

```

```

          190     200     210     220     230     240
Sequen GGCCTCACACCATCGGATGTGCCAGATGGGATTAGCTGGTAGGTGGGGTAATGGCTCAC
      :
EM_PRO  GGCCTCACACCATCGGATGTGCCAGATGGGATTAGCTGGTAGGTGGGGTAACGGCTCAC
        180     190     200     210     220     230

```

```

          250     260     270     280     290     300
Sequen CTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACG
      :
EM_PRO  CTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACG
        240     250     260     270     280     290

```

```

          310     320     330     340     350     360
Sequen GTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATG
      :
EM_PRO  GTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATG
        300     310     320     330     340     350

```

```

          370     380     390     400     410     420
Sequen CAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTTCAGCGGGGAGGA
      :
EM_PRO  CAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTTCAGCGGGGAGGA
        360     370     380     390     400     410

```

```

          430     440     450     460     470     480
Sequen AGGGTTACTGGTTAATAACCAGCGACATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAAC
      :
EM_PRO  AGGGTGAGAGGTTAATAACCTYCTGCATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAAC
        420     430     440     450     460     470

```

```

          490     500     510     520     530     540
Sequen TCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGT
      :
EM_PRO  TCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGT
        480     490     500     510     520     530

```

	550	560	570	580	590	600
Sequen	AAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTTAACCTGGGAAC					
EM_PRO	AAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTTAACCTGGGAAC					
	540	550	560	570	580	590
		610	620	630	640	650
Sequen	TGCATTTGAAACTGGCAGGCTGGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGG					
EM_PRO	TGCATTTCGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGG					
	600	610	620	630	640	650
	670	680	690	700	710	720
Sequen	TGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACT					
EM_PRO	TGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACGAAGACT					
	660	670	680	690	700	710
		730	740	750	760	770
Sequen	GACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCC					
EM_PRO	GACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCC					
	720	730	740	750	760	770
	790	800	810	820	830	840
Sequen	GTAAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTTCCCCTGAGGAGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTT					
EM_PRO	GTAAACGATGTCGACTTGGAGGCTGTTCCCTTGAAGGAGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTT					
	780	790	800	810	820	830
	850	860	870	880	890	900
Sequen	AAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCC					
EM_PRO	AAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCC					
	840	850	860	870	880	890
	910	920	930	940	950	960
Sequen	CGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTTGGCC					
EM_PRO	CGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACC-TGGCC					
	900	910	920	930	940	950
	970	980	990	1000	1010	1020
Sequen	TTGACATCCACAGAACTCAGCAGAGATGCTTTGGTGCCTTCGGGAACGTGTGAGACAGGTG					
EM_PRO	TTGACATCCACGGAATTCTGCAGAGATGCGGAAGTGCCTTCGGGAACCGTGTGAGACAGGTG					
	960	970	980	990	1000	1010
	1030	1040	1050	1060	1070	1080
Sequen	CTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTAAAGTCCCAGCAACGAGCGCA					
EM_PRO	CTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTAAAGTCCCAGCAACGAGCGCA					
	1020	1030	1040	1050	1060	1070
	1090	1100	1110	1120	1130	1140
Sequen	ACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGATTTCGGTCGGGAACCTCAAAGGAGACTGCCGGTGATAA					
EM_PRO	ACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGATTTCGGTCGGGAACCTCAAAGGAGACTGCCGGTGATAA					
	1080	1090	1100	1110	1120	1130

```

                1150      1160      1170      1180      1190      1200
Sequen ACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACAC
      .....
EM_PRO ACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACAC
      1140      1150      1160      1170      1180      1190

                1210      1220      1230      1240      1250      1260
Sequen GTGCTACAATGGCGCATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAG
      .....
EM_PRO GTGCTACAATGGCGCATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAG
      1200      1210      1220      1230      1240      1250

                1270      1280      1290      1300      1310      1320
Sequen TGCGTCGTAGTCCGGATCGGAGTCTGCAACTCGACTCCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAA
      .....
EM_PRO TGCGTCGTAGTCCGGATCGGAGTCTGCAACTCGACTCCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAA
      1260      1270      1280      1290      1300      1310

                1330      1340      1350      1360      1370      1380
Sequen TCGTGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACA
      ....
EM_PRO TCGTAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACA
      1320      1330      1340      1350      1360      1370

                1390      1400      1410      1420      1430      1440
Sequen CCATGGGAGTGGGTTGCAAAAAGAAGTAGGTAGCTTAACCTTCGGGAGGGCGCTTACCACT
      .....
EM_PRO CCATGGGAGTGGGTTGCAAAAAGAAGTAGGTAGCTTAACCTTCGGGAGGGCGCTTACCACT
      1380      1390      1400      1410      1420      1430

                1450      1460
Sequen TTGTGATTCATGACTGGGGTGAGT
      .....
EM_PRO TTGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGT
      1440      1450      1460      1470      1480

```

Figura 3-2: Allineamento delle sequenze nucleotidiche del 16S rRNA dell'FE29 (prima sequenza) e dell'*Erwinia amylovora* ceppo BC (seconda sequenza).

3.3.2 Identificazione dei batteri isolati dall'insetto *A. dispar*

3.3.2.1 Tramite analisi 16S

Sulla base dell'analisi morfologica sono stati scelti 19 batteri tra quelli estratti dall'interno e dall'esterno dell'insetto *A. dispar*, che sono stati analizzati con i primer 16S e sequenziati, secondo le stesse modalità descritte per quelli estratti da materiale sintomatico. L'analisi di sequenza mostra che i batteri appartengono a due famiglie: *Pseudomonadaceae* ed *Enterobacteriaceae*. Per quanto riguarda il primo gruppo la maggior parte delle sequenze ha una identità di sequenza dal 92 fino al 98% con ceppi di *Pseudomonas* spp. isolati da ospiti e regioni differenti (Tab. 3-III) .

Dall'analisi del dendrogramma risulta che i batteri si separano in tre gruppi principali: il gruppo A comprende i batteri che hanno una percentuale di identità tra il 92 e il 96% con *Pseudomonas* isolati da ospiti differenti e in regioni differenti; il gruppo B comprende tre batteri che clasterizzano molto vicini a *P. avellanae*, mentre il ceppo lv31C costituisce il gruppo C che è molto distante dai gruppi A e B. Questo tipo di analisi però non è chiaramente sufficiente per definire un ceppo fino al livello di specie.

Per il gruppo delle Enterobacteriacee cinque colonie avevano il 92% di similarità con *Erwinia amylovora* e quattro circa il 90% con *Pantoea cedenensis* ceppo A e una aveva più del 98% di omologia di sequenza con *Brenneria quercina*. Quest'ultima sequenza è stata effettuata presso il laboratorio del dott. J. L. Vanneste (Hort Research, Ruakura Research Centre, Hamilton, New Zealand) insieme alle analisi biochimiche.

3.3.2.2 tramite primer specifici

Tra i batteri estratti dall'insetto *A. dispar* ed identificati con i primer 16S ne sono stati scelti tre che dall'analisi del dendrogramma (Fig. 3-3) risultavano più vicini a *P. avellanae* e sono stati analizzati in un esperimento di amplificazione con i primer WA e WC (Loreti e Galleli, 2002) indicati come specifici per *P. avellanae*, secondo le modalità descritte precedentemente (par. 2.7).

Il risultato dell'amplificazione è visualizzato su gel riportato in Fig. 3-4.

M 1 2 3 4 5
-- -- -- -- --

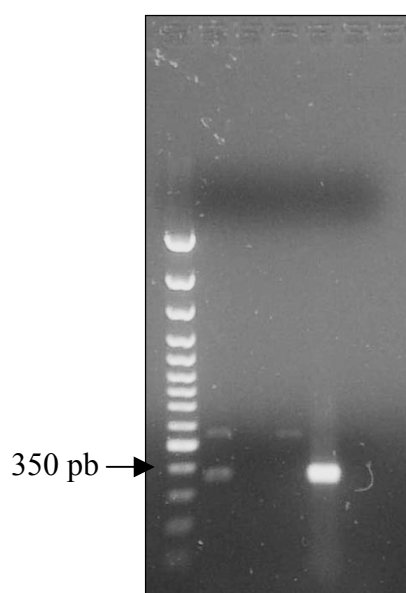


Fig. 3-4. Linea 1-2-3: *Pseudomonas* sp.; linea 4 *P. avellanae*; linea 5 controllo negativo. La freccia indica le dimensioni attese della banda

I risultati evidenziano nel primo campione la presenza del frammento atteso di 350 pb unitamente ad un altro frammento di dimensioni differenti. Lo stesso frammento compare anche nel terzo campione. Questi primer indicati come specifici non ci permettono quindi di identificare con chiarezza se questi isolati appartengono a *P. avellanae*.

3.3.3 Analisi filogenetica

Una volta identificati i batteri isolati da materiale sintomatico e dall' interno/esterno di *A. dispar*, sono stati scelti quelli che presentavano una percentuale di similarità più alta con *P. avellanae* e che appartenevano al genere *Brenneria*, considerati batteri coinvolti nella "moria". Quindi sono state studiate le relazioni genetiche tra questi ceppi e alcuni ceppi noti riportati in Tab. 2-I. Le sequenze sono state allineate con il programma CLUSTALW. Oltre all'allineamento il programma calcola la distanza (percentuale di divergenza) tra tutte le sequenze e applica il metodo NJ (Neighbour Joining) di Saitou e Nei (1987) per la costruzione di un albero filogenetico. In Fig. 3-5 è riportato il filogramma ottenuto. Accanto ai nomi degli isolati sono riportate le misure delle distanze genetiche ottenute.

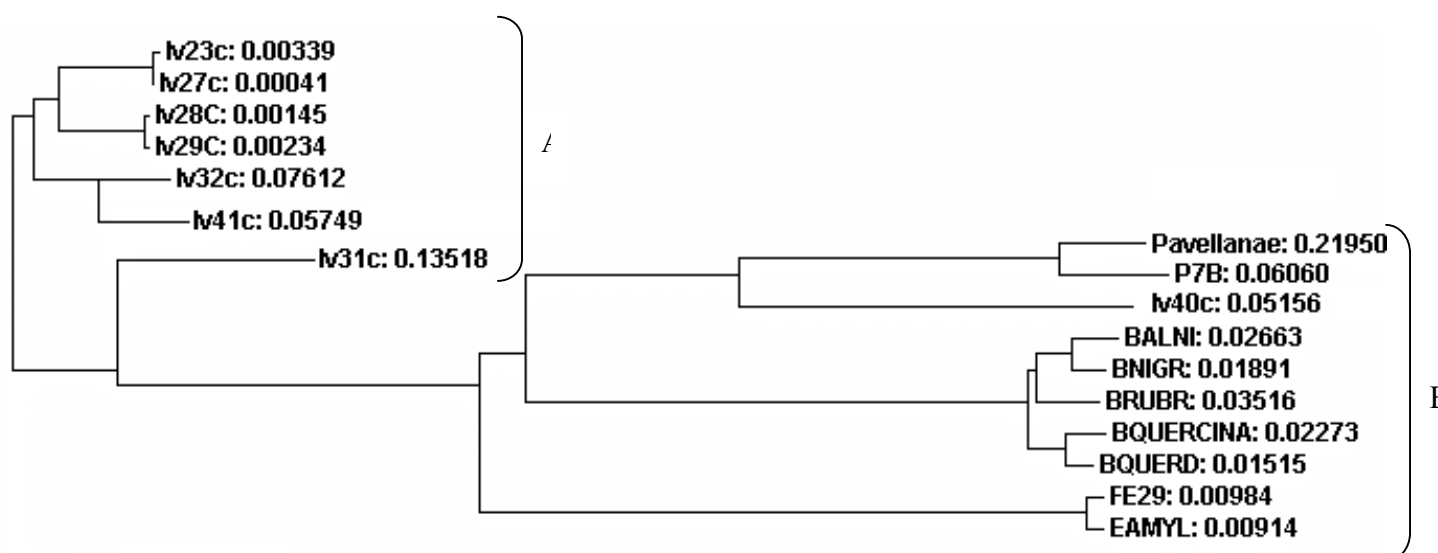


Figura 3-5. Dendrogramma ottenuto con il programma CLUSTALW. Accanto ai nomi degli isolati sono riportate le distanze genetiche.

Il gruppo A comprende i batteri identificati come *Pseudomonas* spp. isolati dall'insetto *A. dispar*, mentre nel gruppo B sono compresi i batteri isolati da piante di nocciolo sintomatiche, ceppi noti provenienti dall'NCPPB, e il ceppo di *B. quercina* isolato dall'insetto. Solo un ceppo isolato dall'insetto, lv40C, clasterizza nel gruppo B. Guardando più in dettaglio questo gruppo si ottiene la Fig. 3-6.

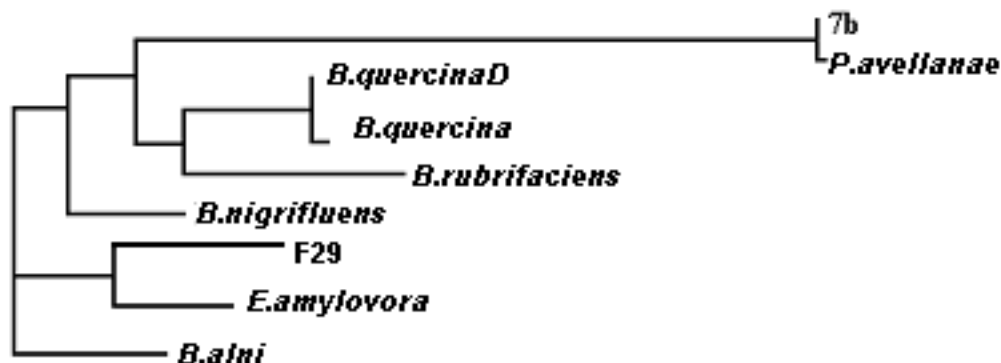


Figura 3-6. Dendrogramma ottenuto con il metodo Neighbour-Joining che mostra le relazioni filogenetiche tra le specie basandosi sull'allineamento delle sequenze del gene 16S rDNA.

La stretta relazione tra il ceppo 7b, isolato da piante di nocciolo affette da moria nella provincia di Viterbo, e *P. avellanae*, deriva dal livello alto di omologia di sequenza del 16S rDNA (99,4 %). L'analisi delle proprietà morfologiche, biochimiche e l'analisi del profilo degli acidi grassi effettuate nello stesso anno dell'isolamento confermerebbero questo risultato.

Il ceppo *B. quercinaD* (estratto dall'insetto *A. dispar*) risulta associato a *Brenneria quercina* (similarità 99,8 %), e anche in questo caso le analisi biochimiche effettuate presso il laboratorio del dott. J. L. Vanneste (Hort Research, Ruakura Research Centre, Hamilton, New Zealand) confermano il dato ottenuto.

La relazione tra la colonia F29 ed *E. amylovora* deriva anche qui dall'elevata percentuale di similarità della sequenza del 16S tra questi due ceppi.

Per approfondire meglio le relazioni tra questi ceppi sono stati utilizzati gli AFLP (capitolo 4).

3.3.4 Confronto tra ceppi di *P. avellanae* Greci e della provincia di Viterbo

Una volta studiate le relazioni tra i batteri appartenenti a generi diversi si è voluto studiare le relazioni esistenti tra i ceppi di *P. avellanae* isolati in Grecia e quelli isolati nella provincia di Viterbo. Le sequenze riportate nella banca dati di EMBL (BPIC 714, ISF 2059, ISPAVE B011) suggeriscono, infatti, che vi sia una differenza in almeno quattro basi nella regione 1-500 del gene 16S. Sono stati quindi scelti i DNA di sei ceppi di *P. avellanae* isolati in Grecia e di quattro ceppi di *P. avellanae* isolati nella provincia di Viterbo da materiale sintomatico e sono stati amplificati con i primer 16S e sequenziati. Le sequenze sono state analizzate mediante il programma clustalW. Tutte le sequenze sono risultate identiche (Figura 3-7).

CLUSTAL W (1.82) multiple sequence alignment

```

3489      TTGAACGCTGGCGGCAGGCCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGCAGCACGGGTACTTGTACC 60
3490      TTGAACGCTGGCGGCAGGCCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGCAGCACGGGTACTTGTACC 60
3491      TTGAACGCTGGCGGCAGGCCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGCAGCACGGGTACTTGTACC 60
4225      TTGAACGCTGGCGGCAGGCCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGCAGCACGGGTACTTGTACC 60
4226      TTGAACGCTGGCGGCAGGCCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGCAGCACGGGTACTTGTACC 60
B636      TTGAACGCTGGCGGCAGGCCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGCAGCACGGGTACTTGTACC 60
74        TTGAACGCTGGCGGCAGGCCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGCAGCACGGGTACTTGTACC 60
153       TTGAACGCTGGCGGCAGGCCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGCAGCACGGGTACTTGTACC 60
29        TTGAACGCTGGCGGCAGGCCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGCAGCACGGGTACTTGTACC 60
7B        TTGAACGCTGGCGGCAGGCCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGCAGCACGGGTACTTGTACC 60
          *****

3489      TGGTGGCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAA 120
3490      TGGTGGCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAA 120
3491      TGGTGGCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAA 120
4225      TGGTGGCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAA 120
4226      TGGTGGCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAA 120
B636      TGGTGGCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAA 120
74        TGGTGGCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAA 120
153       TGGTGGCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAA 120
29        TGGTGGCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAA 120
7B        TGGTGGCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAA 120
          *****

3489      CGCTCGGAAACGGACGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGG 180
3490      CGCTCGGAAACGGACGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGG 180
3491      CGCTCGGAAACGGACGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGG 180
4225      CGCTCGGAAACGGACGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGG 180
4226      CGCTCGGAAACGGACGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGG 180
B636      CGCTCGGAAACGGACGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGG 180
74        CGCTCGGAAACGGACGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGG 180

```

153 CGCTCGGAAACGGACGCTAATACCGCATAACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGG 180
29 CGCTCGGAAACGGACGCTAATACCGCATAACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGG 180
7B CGCTCGGAAACGGACGCTAATACCGCATAACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGG 180

3489 GCCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACC 240
3490 GCCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACC 240
3491 GCCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACC 240
4225 GCCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACC 240
4226 GCCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACC 240
B636 GCCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACC 240
74 GCCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACC 240
153 GCCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACC 240
29 GCCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACC 240
7B GCCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACC 240

3489 AAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAACCTGAGACACGG 300
3490 AAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAACCTGAGACACGG 300
3491 AAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAACCTGAGACACGG 300
4225 AAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAACCTGAGACACGG 300
4226 AAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAACCTGAGACACGG 300
B636 AAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAACCTGAGACACGG 300
74 AAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAACCTGAGACACGG 300
153 AAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAACCTGAGACACGG 300
29 AAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAACCTGAGACACGG 300
7B AAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAACCTGAGACACGG 300

3489 TCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCC 360
3490 TCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCC 360
3491 TCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCC 360
4225 TCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCC 360
4226 TCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCC 360
B636 TCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCC 360
74 TCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCC 360
153 TCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCC 360
29 TCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCC 360
7B TCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCC 360

3489 AGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAA 420
3490 AGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAA 420
3491 AGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAA 420
4225 AGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAA 420
4226 AGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAA 420
B636 AGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAA 420
74 AGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAA 420
153 AGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAA 420
29 AGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAA 420
7B AGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAA 420

3489 GGGCAGTTACCTAATACGTATCTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACT 480
3490 GGGCAGTTACCTAATACGTATCTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACT 480
3491 GGGCAGTTACCTAATACGTATCTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACT 480
4225 GGGCAGTTACCTAATACGTATCTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACT 480
4226 GGGCAGTTACCTAATACGTATCTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACT 480
B636 GGGCAGTTACCTAATACGTATCTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACT 480

```

74      GGGCAGTTACCTAATACGTATCTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACT 480
153     GGGCAGTTACCTAATACGTATCTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACT 480
29      GGGCAGTTACCTAATACGTATCTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACT 480
7B      GGGCAGTTACCTAATACGTATCTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACT 480
*****

3489    CTGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT 502
3490    CTGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT 502
3491    CTGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT 502
4225    CTGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT 502
4226    CTGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT 502
B636    CTGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT 502
74      CTGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT 502
153     CTGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT 502
29      CTGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT 502
7B      CTGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT 502
*****

```

Fig. 3-7. Allineamento delle sequenze nucleotidiche di ceppi di *Pseudomonas avellanae* isolati in Grecia (qui riportati con i numeri di accessione dell'NCPPB) e i ceppi di *P. avellanae* isolati nella provincia di Viterbo (indicati con i numeri 74, 153, 29, 7b)

Dal risultato dell'allineamento è chiaro che l'analisi con il 16S non è un metodo sufficientemente adatto per questo tipo di discriminazione. Anche in questo caso è stato quindi eseguita l'analisi con gli AFLP (capitolo 4).

3.4 DISCUSSIONE

L'analisi di sequenza del gene 16S rRNA è utilizzata da tempo per l'identificazione dei batteri e per lo studio delle relazioni filogenetiche tra specie appartenenti allo stesso genere. E' stata utilizzata, ad esempio, per chiarire la tassonomia dei generi *Erwinia* e *Pseudomonas* sia a livello intragenerico che intergenerico (Kwon *et al.*, 1997; Anzai *et al.*, 2000). In questa ricerca è stata impiegata per un iniziale screening dei batteri isolati da piante di nocciolo sintomatiche e dall'interno/esterno dell'insetto *A. dispar*, ed ha consentito di dare una prima indicazione di quali batteri fossero putativamente coinvolti nella "moria" del nocciolo. Inoltre l'utilizzo di un metodo rapido di estrazione di DNA dalla cellula batterica, impiegando direttamente la colonia (par. 2.4) senza passare da fasi di estrazione, si è dimostrato molto efficace nell'incrementare la velocità di analisi.

Nella nostra indagine l'analisi del 16S si è rivelata risolutiva solo al livello di distinzione tra genere, mentre a livello intraspecifico la diversità è risultata ridotta (ad esempio tra le specie del genere *Pseudomonas* il valore di omologia non è stato inferiore al 95%). Un recente lavoro (Clarridge, 2004) attribuisce come necessario un coefficiente di similarità tra due sequenze >99% per definire l'appartenenza ad una determinata specie, ed un valore di similarità tra il 95% e il 99% per definire l'appartenenza ad un determinato genere.

L'impiego di questo marcatore rimane comunque un eccellente metodo di identificazione massale se comparato ai metodi classici. Questi richiedono, infatti, per ciascun batterio, l'isolamento di colture pure e test che analizzino alcune caratteristiche fenotipiche, quali i caratteri biochimici e morfologici, che richiedono molto tempo per una accurata caratterizzazione nell'interpretazione dei risultati.

L'analisi del 16S rRNA si è rivelata, anche nel nostro caso, efficace nell'individuare le relazioni tra specie appartenenti a generi diversi. Ad esempio le specie appartenenti al genere *Brenneria*, allorché le sequenze del 16S sono state allineate con quelle delle altre specie, risultavano nel filogramma separate dalle altre. Dall'impiego del programma CLUSTALW, che ha permesso la costruzione di un albero di consenso per studiare le loro relazioni filogenetiche, è emerso che i batteri, identificati come appartenenti al genere *Pseudomonas* ritrovati nell'insetto,

clusterizzano separatamente dai batteri identificati come *P. avellanae* isolati da piante di nocciolo sintomatiche. Questa diversità all'interno dello stesso genere non è sorprendente in quanto si potrebbe trattare, nel primo caso, di batteri adattati a vivere all'interno e/o esterno dell'insetto mentre, nel secondo caso, di batteri endofiti di piante.

Per quanto riguarda i batteri appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae* è risultato interessante l'elevata identità di sequenza del ceppo FE29 con *E. amylovora* e del ceppo isolato dall'insetto identificato come *B. quercina* con il ceppo noto corrispondente. Entrambi i batteri infatti hanno caratteristiche che si possono accostare da un punto di vista biochimico all'*Erwinia* gruppo *amylovora* ritrovata nel Viterbese negli anni '80 (Varvaro *et al.*, 1990).

Infine, il confronto tra le sequenze del gene 16S dei ceppi di *P. avellanae*, da noi isolati, con quelle presenti nella banca dati di EMBL (BPIC 714, ISF 2059, ISPAVE B011), ha evidenziato che nelle prime sono assenti le mutazioni delle basi (4) presenti invece negli ultimi, nella regione 1-500 del gene 16S. Pertanto, per un migliore impiego di questo gene come marcatore molecolare, occorrerebbe sequenziarlo interamente, per verificare eventuali mutazioni puntiformi in regioni diverse da quelle analizzate in questo lavoro. Poiché in queste specie è presente un elevato grado di conservazione del 16S, il ricorso a tecniche che danno l'opportunità di indagare una più elevata dimensione del genoma potrebbe rivelarsi più risolutiva.

CAPITOLO 4 ANALISI AFLP DEI BATTERI

4.1 Le tecniche di fingerprinting del DNA

Negli ultimi dieci anni sono state sviluppate numerose tecniche di fingerprinting del DNA per produrre marcatori genetici in grado di determinare differenze tra i DNA, per discriminare gli individui fino al livello di specie. Le tecniche attualmente disponibili sono: RFLP (restriction fragment length polymorphisms) (Liu e Furnier 1993), DAF (DNA amplification fingerprinting), (Caetano-Anolles e Gresshoff 1991), REP-PCR (arbitrarily primed PCR) (Welsh e McClelland, 1990), RAPD (randomly amplified polymorphic DNAs) (Williams *et al.*, 1990), microsatelliti (Tautz, 1989), e più recentemente AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms), (Zabeau and Vos 1993; Vos *et al.* 1995).

L'analisi RFLP richiede una quantità di materiale di partenza relativamente grande e produce poche bande o caratteri. In più se i prodotti PCR devono essere successivamente analizzati ciò richiede di conoscere prima informazioni sulla sequenza.

DAF, REP-PCR e RAPD sono tecniche basate sulla PCR, che richiedono molto meno materiale di partenza e producono numerose bande polimorfiche. L'insieme di frammenti di DNA generato da queste tecniche dipende dalla sequenza dei primer e dalla natura del DNA. Non richiedono la caratterizzazione della sequenza del genoma e la PCR è effettuata a basse temperature di annealing per permettere ai primer di ibridizzarsi su più loci. Il limite di queste tecniche è dovuto principalmente alla necessità di ripetere la PCR più volte e alla scarsa ripetibilità.

I Microsatelliti offrono molti vantaggi ma l'elevato costo e il tempo richiesto per sviluppare dei primer specifici per ogni specifica applicazione ne ha limitato l'uso in molti laboratori.

4.1.1 Caratteristiche generali degli AFLP

La tecnica degli AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms) è una delle numerose tecniche di DNA fingerprinting che trae vantaggio dalla PCR (polymerase chain reaction) per amplificare una serie di frammenti di DNA da uno specifico campione (Vos *et al.*, 1995; Blears *et al.*, 1998). Di solito la scelta di quale tecnica di

fingerprinting utilizzare dipende da 1) l'applicazione, genotipizzazione del DNA, mappatura genetica, genetica di popolazione; 2) l'organismo da indagare, procarioti, piante, animali, uomo; e 3) le risorse, tempo e denaro disponibili. Nessuna tecnica è ideale per tutte le applicazioni. Comunque gli AFLP stanno diventando rapidamente lo strumento di scelta per molte applicazioni e organismi. Le potenziali applicazioni includono screening di marcatori DNA legati a tratti genetici, analisi parentale, genotipizzazione forense, marker diagnostici per patogeni che causano malattie, e genetica di popolazioni. Inoltre, poichè la tecnica degli AFLP può essere applicata ad un'ampia varietà di organismi di cui non si conoscono precedenti informazioni sulla sequenza del DNA, questa tecnica potrebbe diventare uno strumento molto utile per l'analisi di fingerprinting del DNA.

Gli AFLP possono essere utilizzati per distinguere anche organismi strettamente correlati. Le differenze nelle lunghezze dei frammenti generati da questa tecnica possono essere generate da cambiamenti presenti ai siti di restrizione o da inserzioni o da delezioni presenti all'interno del DNA. Ma soprattutto gli AFLP sono riproducibili e affidabili. Questo è almeno in parte dovuto al fatto che solo una piccola parte dei primer ha una sequenza casuale e che essi sono legati al DNA sotto stringenti condizioni di ibridazione.

I dati generati con gli AFLP sono di solito trattati come marcatori dominanti, finchè l'identità dell'omo/eterozigote non può essere stabilita, a meno che non siano effettuati studi di pedigree per determinare il pattern di eredità di ogni banda. Comunque il grande numero di bande dà una stima della variazione lungo l'intero genoma, dando così una buona immagine generale del livello di variazione genetica.

La tecnica degli AFLP sta quindi rapidamente divenendo il metodo di scelta per stimare la diversità genetica sia nelle popolazioni batteriche sia *in vitro* che *in vivo* (Hill *et al.*, 1996; Karp *et al.*, 1996; Lu *et al.*, 1996; Paul *et al.*, 1997; Qamaruz-Zaman *et al.*, 1997; Sharma *et al.*, 1996; Travis *et al.*, 1996).

Le caratteristiche principali della tecnica degli AFLP sono le seguenti:

- **E' relativamente veloce**
- **Saggia l'intero genoma.**

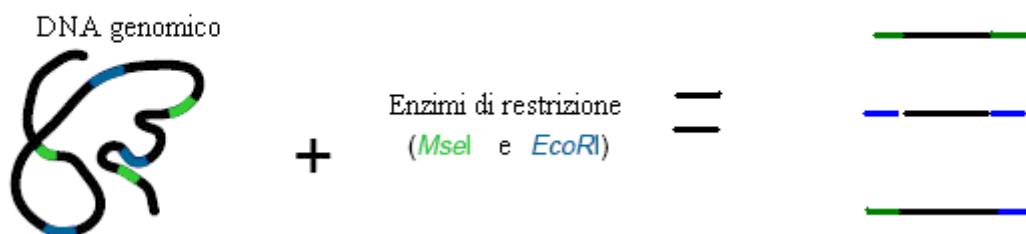
- **Richiede relativamente piccole quantità di DNA genomico.** Di solito sono richiesti 0.05 - 0.5 µg di DNA, a seconda della grandezza del genoma.
- **Fornisce da 10 a 100 volte più marcatori** ed è così più sensibile rispetto ad altre tecniche di fingerprinting (e.g., isozymes, RFLPs, microsatelliti); (Lu *et al.*, 1996; Sharma *et al.*, 1996).
- Al contrario dei RAPD, **è altamente riproducibile.** Le analisi effettuate da differenti operatori o in differenti laboratori possono essere comparate o riprodotte.
- Al contrario dei microsatelliti, **non richiede l'utilizzo di primer specifici** . Sono disponibili oggi numerosi primer che sono adatti per la maggior parte degli organismi.

4.1.2 Principali passaggi della tecnica degli AFLP

Gli AFLP prevedono cinque passaggi:

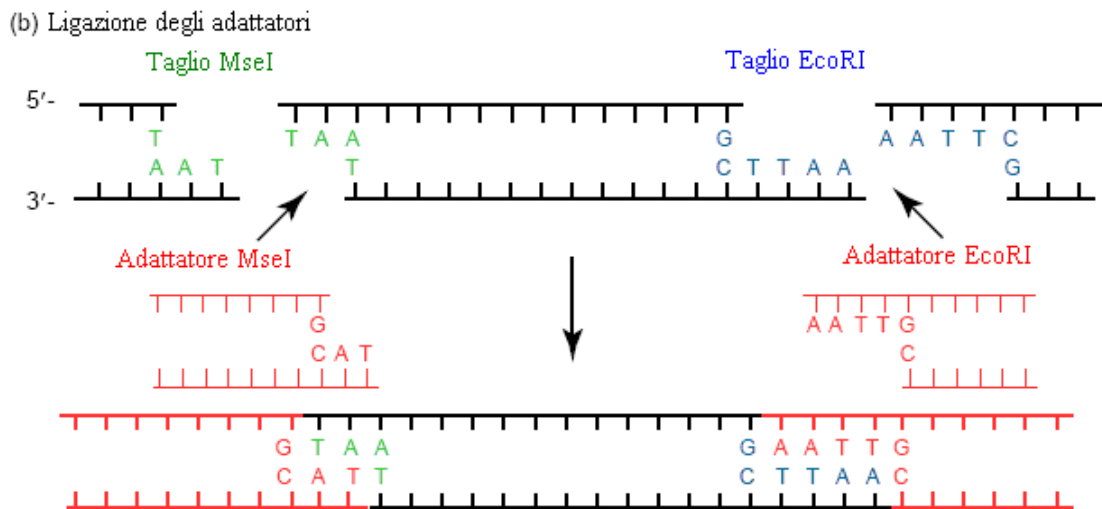
I. Frammentazione del DNA genomico: i frammenti di restrizione del DNA vengono prodotti utilizzando due differenti enzimi di restrizione: uno che taglia frequentemente (ad es. l'enzima di restrizione *MseI*) e uno che taglia raramente (come l'enzima di restrizione *EcoRI*). In questo modo sono prodotti tre tipi di frammenti di restrizione: uno con tagli con *EcoRI* ad entrambe le estremità, uno con un taglio *EcoRI* ad una estremità e un taglio *MseI* all'altra estremità, e uno con tagli con *MseI* ad entrambe le estremità.

(a) Frammentazione del DNA



II. Ligazione degli adattatori oligonucleotidici: gli adattatori a doppio filamento consistono di una sequenza centrale e di una sequenza enzima specifica. Sono specifici

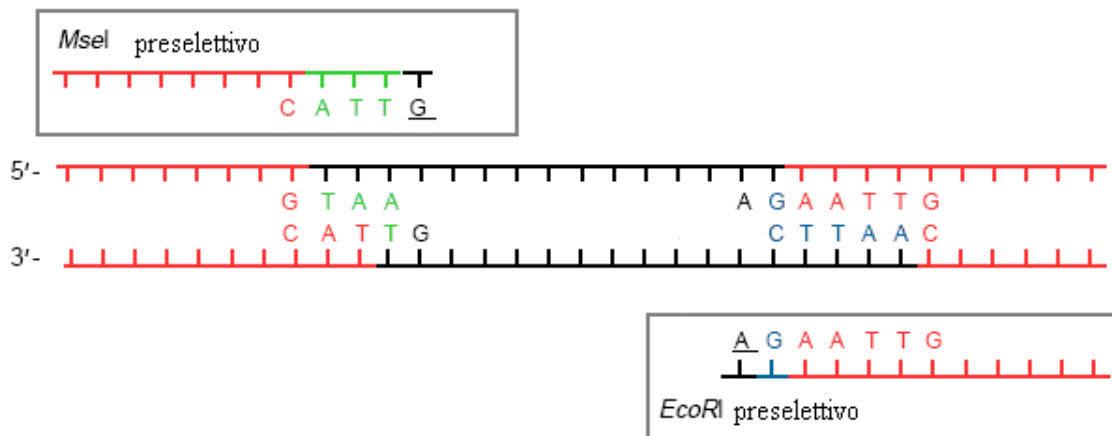
sia per il sito *EcoRI* sia per quello *MseI*. Restrizione e ligazione avvengono in una singola reazione. La ligazione degli adattatori al DNA frammentato altera il sito di restrizione e così impedisce che una seconda restrizione abbia luogo dopo che la ligazione è avvenuta.



III. Amplificazione preselettiva: i primers utilizzati in questo step consistono di una sequenza centrale, una sequenza enzima specifica e una estensione di una singola base selettiva al terminale 3'. Le sequenze degli adattatori e dei siti di restrizione servono come sito di legame per questi primer per una “amplificazione preselettiva”. Ogni primer preselettivo ha un nucleotide “selettivo” che sarà riconosciuto da quei frammenti di restrizione che posseggono quel nucleotide oltre il sito di restrizione.

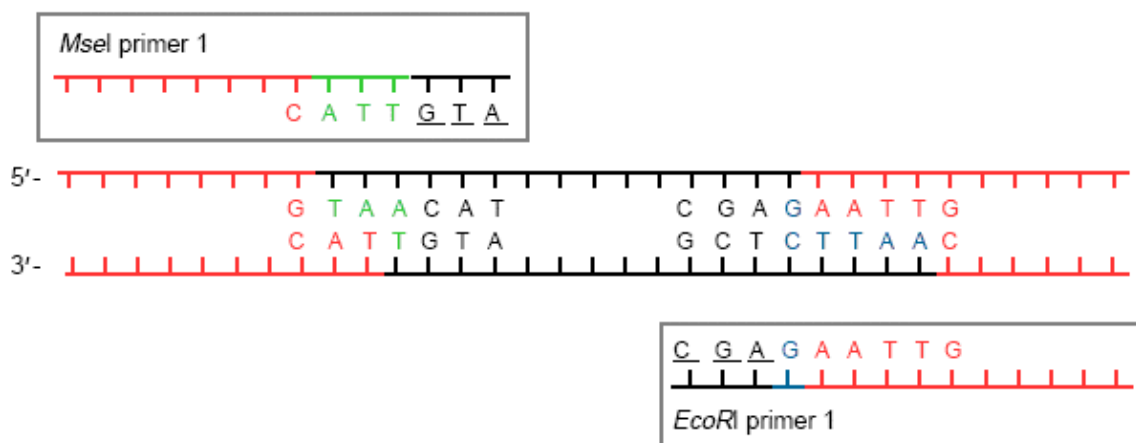
I prodotti della PCR preselettiva sono quindi quei frammenti che hanno un taglio *MseI* e un taglio *EcoRI*, ed hanno anche il nucleotide complementare interno. Il passaggio della amplificazione preselettiva consente una riduzione di 16 volte della complessità della miscela dei frammenti.

(c) Amplificazione preselettiva



IV. Amplificazione selettiva con primer marcati: questi primer consistono di una sequenza identica a quella dei primer preselettivi più uno o più nucleotidi selettivi al terminale 3'. In questo modo la complessità del genoma viene ulteriormente ridotta perché solo quei frammenti che posseggono tutti i nucleotidi selettivi saranno amplificati in questo passaggio. Differenti combinazioni di primer genereranno differenti frammenti. Spesso si utilizza uno screening preliminare per scegliere le combinazioni di primer che genereranno un sufficiente numero di frammenti per la specie studiata.

(c) Amplificazione selettiva



V. Analisi basata sul gel dei frammenti amplificati. Poiché i frammenti sono marcati con marcatori fluorescenti, possono essere separati e quantificati utilizzando un

sequenziatore automatico. Il software GeneScan analizza quattro differenti etichette fluorescenti visualizzate con i colori blu, verde, giallo e rosso. Più campioni (amplificati con primer marcati con fluorocromi diversi) possono essere caricati in un solo capillare insieme con uno standard interno di DNA, anch'esso marcato. Così l'analisi multipla riduce il tempo e i costi dell'analisi. I risultati del GeneScan sono visualizzati come un elettroferogramma (Figura 4-1) e possono essere importati nel programma Genotyper per la successiva analisi dei dati. Questo software identifica e misura le bande che hanno una lunghezza compresa tra le 50 e le 500 paia di basi. Le bande (alleli) sono registrate come presenti o assenti e viene costruita una matrice binaria. La matrice è poi analizzata utilizzando metodi come UPGMA per l'analisi dei cluster.

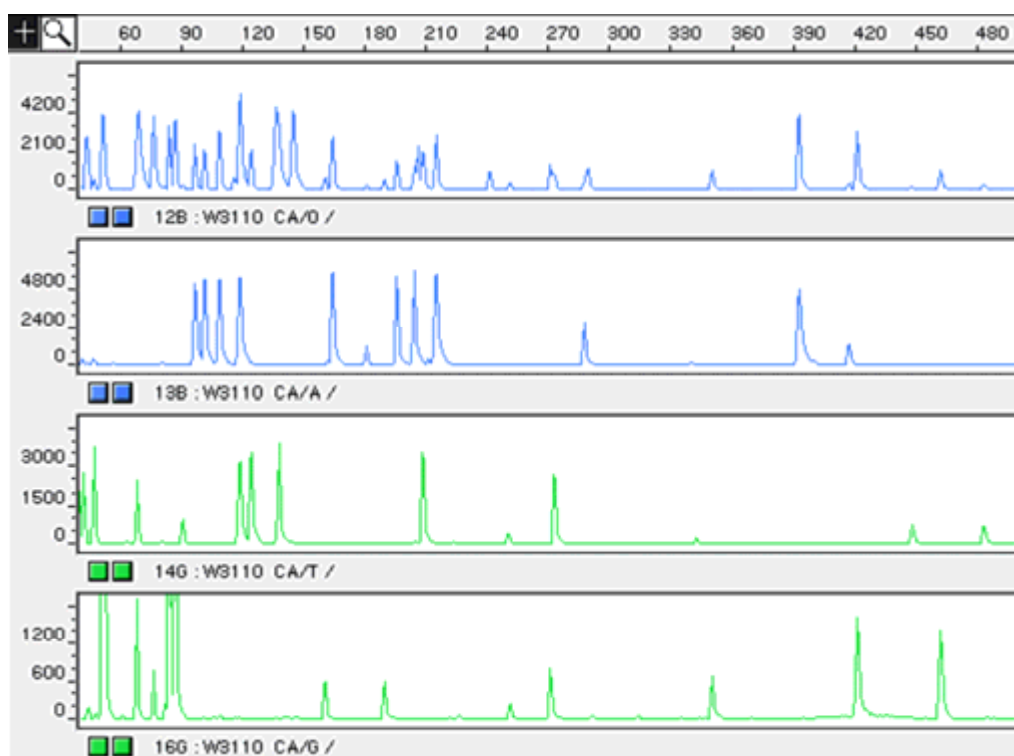


Figura 4-1. AFLP fingerprinting del DNA di riferimento *E. coli* W3110 ottenuto con i primer selettivi MseI- CA e i primer fluoresceinati EcoRI-0, EcoRI-A, EcoRI-T, ed EcoRI-G (dall'alto verso il basso rispettivamente).

4.2 MATERIALI E METODI

4.2.1 AFLP (Amplified fragment length polymorphism)

Gli AFLP sono marcatori molecolari prodotti combinando le tecniche sia degli RFLP che della PCR. La tecnica si basa infatti sulla amplificazione selettiva di una serie di frammenti di restrizione utilizzando la PCR. L'insieme di bande ottenuto o "fingerprinting" può essere utilizzato per monitorare l'identità di un isolato o il grado di similarità tra gli isolati. Quando sono comparati infatti i "fingerprinting" di specie simili possono essere osservate sia bande comuni che bande differenti. Queste differenze sono dette polimorfismi e sono ottenuti da differenze presenti nella sequenza di DNA presente ai siti di restrizione come inserzioni, delezioni, o inversioni.

Gli AFLP presentano numerosi vantaggi rispetto ad altre tecnologie quali RAPD, RFLP, o microsatelliti: richiedono piccole quantità di DNA, producono risultati riproducibili e sono altamente risolutivi a causa delle stringenti condizioni della PCR.

La procedura degli AFLP è stata eseguita come descritto precedentemente (Vos *et al.*, 1995) con piccole modifiche di seguito riportate.

4.2.2 Legame degli adattatori ai frammenti di restrizione

Il primo step della tecnica degli AFLP è quello di generare dei frammenti di restrizione utilizzando due endonucleasi di restrizione, in questo caso MseI e EcoRI (New England Biolabs). Adattatori a doppio filamento vengono poi legati al terminale dei frammenti di DNA, generando così il DNA template per la successiva amplificazione PCR. La sequenza degli adattatori è riportata nella Tabella 4-I. Restrizione e ligazione sono stati effettuati in una singola reazione poiché i buffer erano compatibili utilizzando il kit AFLP Microbial fingerprinting della Applied Biosystem. A differenza di quanto riportato nella metodica del kit gli adattatori non sono stati riscaldati a 95°C per 5 min prima dell'utilizzo in quanto dall'esito delle prime prove è risultato che il loro scongelamento a temperatura ambiente produce gli stessi risultati ed evita una degradazione degli stessi.

La reazione di Master Mix e la reazione di restrizione-ligazione sono stati preparati come segue:

Enzyme Master Mix

N° Campioni	1
10X T4DNA ligase buffer	0,1 µl
0.5M NaCl	0,1 µl
MseI (10u/ul)	0,1 µl
EcoRI (20u/ul)	0,25 µl
T4 DNA ligase (10u/ul)	0,1 µl
H2O	0,35 µl

RESTRICTION-LIGATION

10x T4 DNA ligase buffer	1 µl
0.5M NaCl	1 µl
Adattatore MseI	1 µl
Adattatore EcoRI	1 µl
BSA (1mg/ml)	0,5 µl
Enzyme master mix	1 µl

Nei tubi contenenti 10 ng di DNA sono stati aggiunti 5.5 µl di reazione di restrizione-ligazione. I campioni sono stati incubati per due ore a 37° C in un 2400 Thermocycler (Perkin Elmer-Applied Biosystems, Warrington, UK). I campioni sono stati diluiti con 189 µl di buffer TE (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 0,1 mM EDTA).

4.2.3 Amplificazione preselettiva

La sequenza degli adattatori e dei siti di restrizione servono poi come siti di legame per i primer per una successiva amplificazione preselettiva dei frammenti di restrizione. Solo quei frammenti che posseggono un adattatore verranno amplificati in modo esponenziale durante l'amplificazione PCR. La miscela per l'amplificazione è stata preparata come segue:

DNA diluito	4 µl
Primer preselettivo MseI	0,5 µl
Primer preselettivo EcoRI	0,5 µl
Core Mix	15 µl

I parametri utilizzati per l'amplificazione preselettiva sono stati i seguenti: uno step a 72°C per 2 minuti, seguito da 20 cicli a 94°C per 20 secondi 56°C per 30 secondi e

72°C per 2 minuti con una estensione finale a 72°C per 4 minuti. Del risultante prodotto PCR, 5 µl sono stati diluiti in 95 µl di tampone TE (anziché 10µl in 190µl di tampone) per conservare il prodotto PCR non diluito per ulteriori amplificazioni ed utilizzati come template per la successiva amplificazione selettiva.

4.2.4 Amplificazione selettiva

Questa ulteriore amplificazione PCR serve per ridurre la complessità dei frammenti e utilizza dei primer fluoresceinati contenenti uno o più nucleotidi al loro terminale. La miscela per la reazione è stata preparata come segue:

DNA diluito	1,5 ul
Selective primer MseI	0,5
Selective primer EcoRI	0,5
Core Mix	7,5

La reazione è stata effettuata nel 2400 Thermocycler (Perkin Elmer-Applied Biosystems, Warrington, UK) con il programma riportato in figura 4-2.

94°C.....2 min.....	Denaturazione iniziale	
94°C.....20 sec....	denaturazione	
66°C.....30 sec....	annealing	
72°C.....2 min....	estensione	
94°C.....20 sec....	denaturazione	}.....9 cicli
Decrease 1°C/cycle	30 sec....annealing	
72°C.....2 min....	estensione	
94°C.....20 sec....	denaturazione	}.....20 cicli
56°C.....30 sec....	annealing	
72°C.....2 min....	estensione	
60°C.....30 min.....	incubazione finale	

Figura 4-2. Programma della reazione PCR

4.2.5 Analisi dei frammenti mediante sequenziatore automatico

L'amplificazione selettiva con primer fluoresceinati in combinazione con l'elettroforesi su un sequenziatore automatico, incrementa notevolmente la risoluzione dei frammenti. In questo modo infatti si ottiene una chiara separazione tra le bande perché la migrazione di ogni frammento non è limitata dalle dimensioni del gel (Huang e Liu, 1999).

I campioni amplificati sono stati denaturati preparando per ciascuno una miscela contenente 20µl di formammide, 0,5µl di standard GeneScan-500 (ROX) che è stata aggiunta a 0,5µl di prodotto della amplificazione selettiva. La miscela è stata riscaldata a 95°C per 5 minuti, messa in ghiaccio e i tubi posizionati nel caricatore a 48 posti del sequenziatore ABI Prism 310 (Applied Biosystem Inc., Foster City, California).

ADATTATORI E PRIMER	SEQUENZA
Adattatore EcoRI	5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3' 3'-CTGACGCATGGTTAA-5'
Adattatore Mse-I	5'-GACGATGAGTCCTGAG-3' 3'-TACTCAGGACTCAT-5'
EcoRI primer non selettivo	5'-GACTGCGTACCAATTTC-3'
MseI primer non selettivo	5'-GATGAGTCCTGAGTAA-3'
Primer selettivi	
E1	5'-GACTGCGTACCAATTCA-3'
E2	5'-GACTGCGTACCAATTCC-3'
E3	5'-GACTGCGTACCAATTCCG-3'
E4	5'-GACTGCGTACCAATTCT-3'
M1	5'-GATGAGTCCTGAGTAA-3'
M2	5'-GATGAGTCCTGAGTAAC-3'
M3	5'-GATGAGTCCTGAGTAAG-3'
M4	5'-GATGAGTCCTGAGTAAT-3'

Tabella 4-I. Sequenze degli adattatori e dei primer utilizzati per gli AFLP; in rosso sono riportate le basi aggiuntive utilizzate per i primer selettivi.

4.2.6 Costruzione del dendrogramma

Una volta raccolti, i dati sono stati analizzati con il GeneScan Analysis software e importati in Genotyper. La presenza o assenza di picchi (figura 4-3) è stata registrata in una tabella binaria con 1 (presenza) 0 (assenza) utilizzando il programma PowerTyper™ 16 Macro, che è stata utilizzata per costruire una matrice di similarità utilizzando il coefficiente di Jaccard. L'analisi dei cluster è stata effettuata con il metodo UPGMA nella procedura SAHN del programma NTSys.pc program versione 2.1 (Rohlf, 1994) e i dendrogrammi sono stati costruiti e plottati con l'opzione TREE.

Matrici di valore cofenetico sono state compute dalle corrispondenti matrici ottenute dai dendrogrammi (utilizzando la procedura CPH) e comparate con le originali matrici di similarità per stimare la qualità della misura (utilizzando la procedura MXCOMP). Il programma computa il prodotto di correlazione, r , e il test statistico di Mantel, Z , per misurare il grado di correlazione tra le due matrici (Rohlf 1994).

La qualità della misura può essere interpretata come segue:

$0,9 < r$ Misura molto buona; $0,8 < r < 0,9$ Misura buona; $0,7 < r < 0,8$ Misura mediocre; $r < 0,7$ Misura insufficiente.

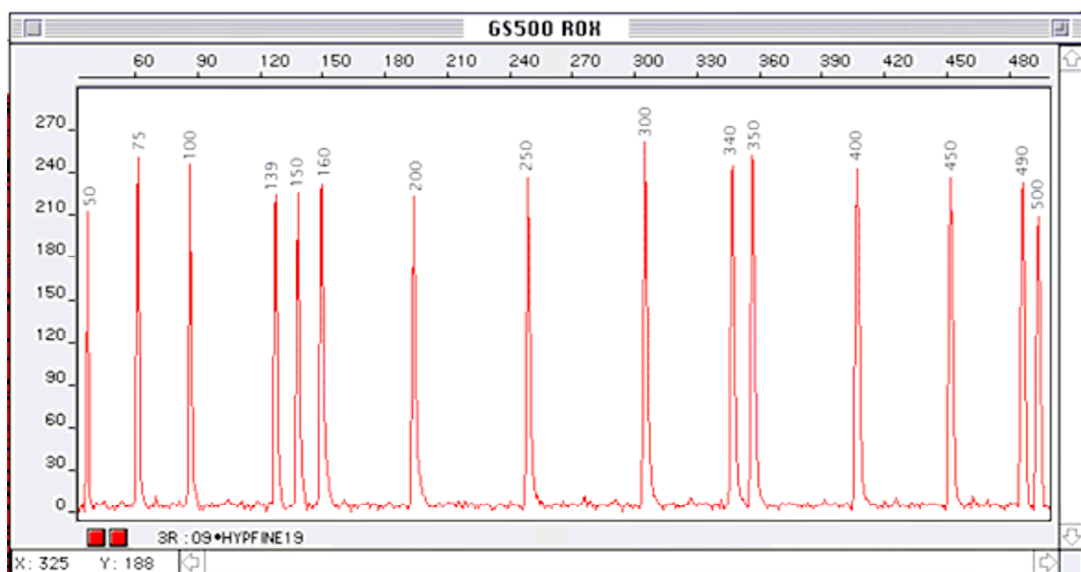


Figura 4-3. Elettroferogramma dello standard Gene Scan 500 corso in condizioni denaturanti nelle quali si può raggiungere un range di separazione per frammenti che hanno dimensioni fino a 500pb.

4.3 RISULTATI

4.3.1 Analisi AFLP dei batteri analizzati con primer 16S

L'obiettivo di questo lavoro è stato quello di utilizzare una tecnica specifica ed affidabile per ottenere una discriminazione tra i batteri coinvolti nella "moria" del nocciolo. I risultati ottenuti dall'analisi con il gene 16S hanno consentito di identificare sia batteri con una percentuale di identità molto alta con *P. avellanae* sia batteri come FE29 sia le Brennerie che si possono accostare, dal punto di vista biochimico e in alcuni casi per il quadro sintomatologico determinato sui loro ospiti, ai ceppi di *Erwinia* gruppo *amylovora* isolato da nocciolo con sintomi di moria. Questi stessi ceppi analizzati mediante i primer 16S sono stati sottoposti ad analisi con AFLP.

Recenti esperimenti con AFLP sui batteri (Rico *et al.*, 2004) hanno indicato che l'amplificazione con tre primer selettivi non produce abbastanza informazioni sul fingerprinting dal momento che produce >10 bande. Per questo motivo si è deciso di utilizzare primer con una sola base selettiva allo scopo di aumentare la possibilità di individuare i polimorfismi tra le bande. Per tutti i ceppi sono state utilizzate le combinazioni di primer riportate nella Tabella 4-II.

Combinazione di primer	Numero di bande ottenute
M1-E1FAM	32-44
M1-E2NED	32-49
M1-E3JOE	29-62
M1-E4JOE	15-16
M2-E1FAM	30-64
M2-E2NED	27-58
M2-E3JOE	46-81

Tabella 4-II. Combinazioni di primer utilizzati per l'amplificazione selettiva e numero di bande ottenute

La sequenza dei primer è quella già riportata in Tabella 4-I.

Le bande ottenute utilizzando tutte le combinazioni di primer riportati in Tabella 4-II sono state utilizzate per computare un'unica matrice di similarità utilizzando il coefficiente di Jaccard e per costruire un albero filogenetico.

Il dendrogramma ottenuto è mostrato in Figura 4-4.

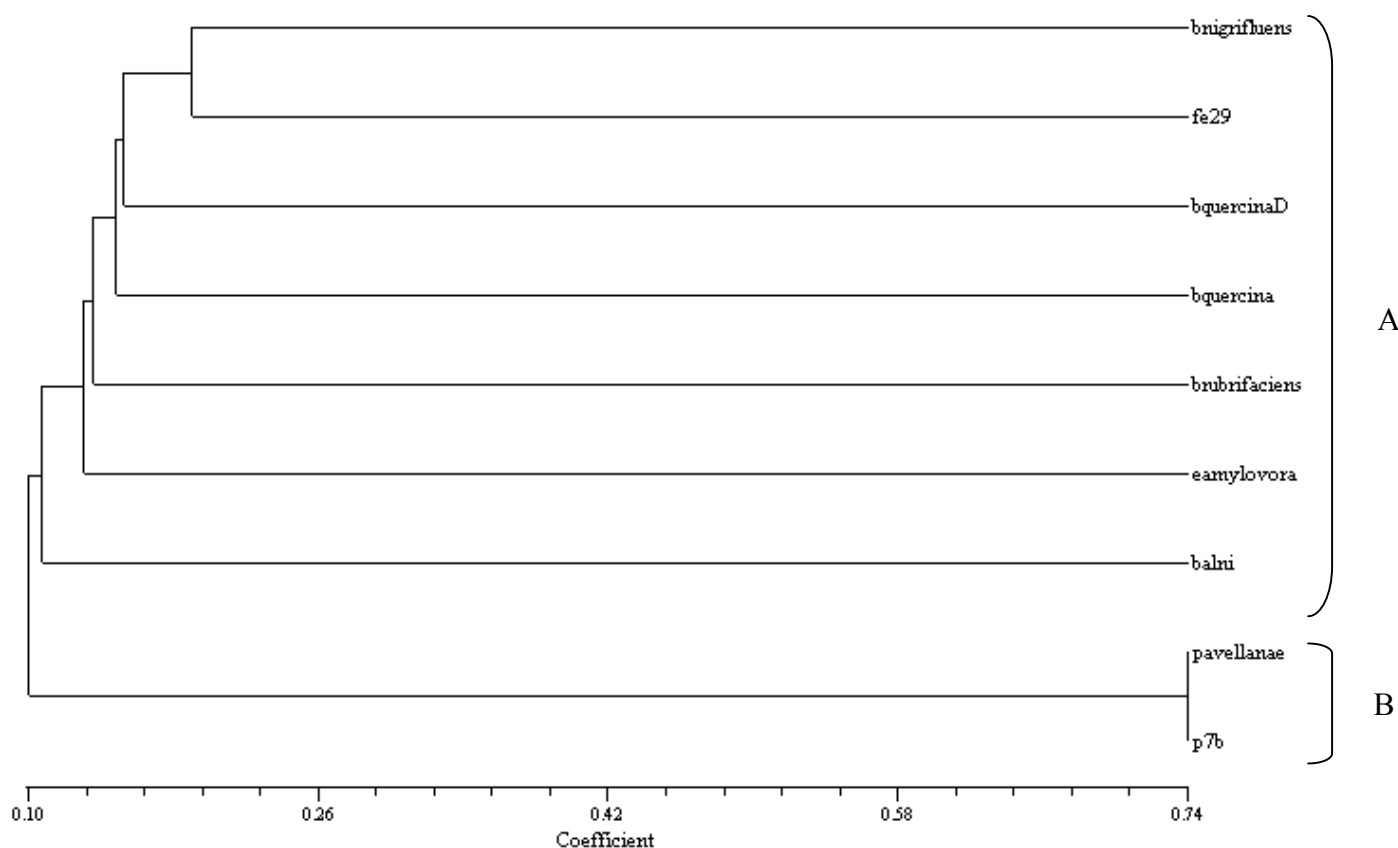


Figura 4-4. Dendrogramma basato sull'analisi dei cluster UPGMA con il programma NTSYS-PC utilizzando il fingerprinting degli AFLP ottenuto con la combinazione di tutti i primer.

L'analisi UPGMA mostra che i ceppi sono clusterizzati in due gruppi principali: il gruppo A ed il gruppo B. Il primo comprende le *Brennerie* che hanno diverse origini, *Erwinia amylovora*, e FE29 che ha un coefficiente di similarità del 18% con *Brenneria nigrifluens* e *Brenneria quercinaD*. Un risultato differente era stato ottenuto dall'analisi delle sequenze 16S in cui il ceppo FE29 mostrava un'alta similarità di sequenza con *E. amylovora*. Il gruppo B comprende le *Pseudomonadi* con il ceppo 7b isolato a Capranica nel 1994 che ha una identità del 74% rispetto al ceppo NCPPB 3872. In questo caso il risultato degli AFLP conferma quello ottenuto dall'analisi 16S.

4.3.2 Analisi AFLP degli isolati di *P. avellanae*:

Gli AFLP sono stati impiegati per ulteriori studi di relazione tra i ceppi di *P. avellanae* isolati da piante di nocciolo sintomatiche nella provincia di Viterbo e quelli isolati in Grecia. Tra quelli isolati nella provincia di Viterbo sono stati scelti 20 ceppi che avevano le seguenti caratteristiche: erano di colore bianco-perla e levano positivi su ANS, producevano un pigmento fluorescente su KB e mostravano la similarità più alta con *P. avellanae* e *P. syringae* nell'analisi del profilo degli acidi grassi. Le colonie sono riportate nella Tabella 4-III insieme al risultato dell'analisi con gli acidi grassi. Per quanto riguarda l'ospite, il luogo e l'anno di isolamento si rimanda alla Tabella 2-I.

	Nome del ceppo	Percentuale di similarità
1	153C	0,883 <i>P.avellanae</i>
2	29C	0,870 <i>P.avellanae</i>
3	74C	0,864 <i>P.avellanae</i>
4	8bC	0,856 <i>P.avellanae</i>
5	19bC	0,852 <i>P.avellanae</i>
6	148C	0,809 <i>P.avellanae</i>
7	151C	0,791 <i>P.avellanae</i>
8	27C	0,789 <i>P.avellanae</i>
9	19aC	0,732 <i>P.avellanae</i>
10	157C	0,701 <i>P.avellanae</i>
11	7bC	0,918 <i>P.syringae</i>
12	30C	0,886 <i>P.syringae</i>
13	28bC	0,830 <i>P.syringae</i>
14	57C	0,775 <i>P.syringae</i>
15	7aC	0,747 <i>P.syringae</i>
16	26C	0,719 <i>P.syringae</i>

Tabella 4-III. Elenco dei ceppi analizzati con gli AFLP e risultato degli acidi grassi

Tutti questi ceppi sono stati analizzati anche con i primer specifici per *P. avellanae* WA e WC (riportati nel par.2.7) e hanno dato tutti la banda attesa di 350 pb (Fig. 4-5).

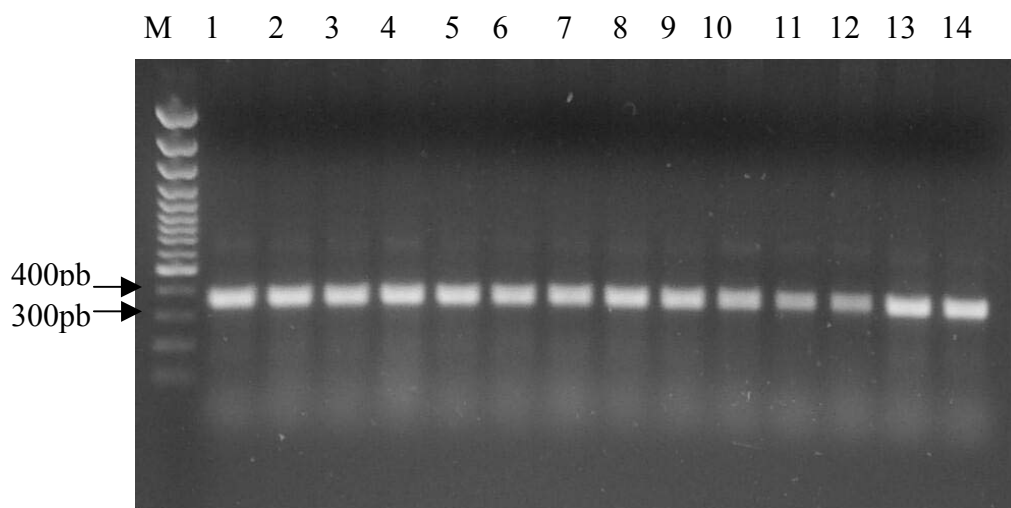


Figura 4-5. Analisi elettroforetica degli amplificati ottenuti in PCR dal DNA genomico dei ceppi riportati in Tab. 4-III utilizzando i primer specifici WA e WC.

I ceppi isolati da piante di nocciolo sintomatiche nel nord della Grecia sono stati acquistati dall'NCPPB e sono riportati in Tabella 2-I.

Per l'amplificazione selettiva sono stati utilizzati i primer M2E3 la cui sequenza è riportata in Tabella 4-I. I frammenti ottenuti sono stati caricati su un sequenziatore automatico i cui risultati sono riportati in forma di cromatogrammi come quelli riportati in Fig. 4.6. La presenza o assenza di picchi è stata registrata in una tabella binaria con 1 (presenza) 0 (assenza) che è stata utilizzata per costruire una matrice di similarità utilizzando il coefficiente di Jaccard, e per effettuare l'analisi dei cluster.

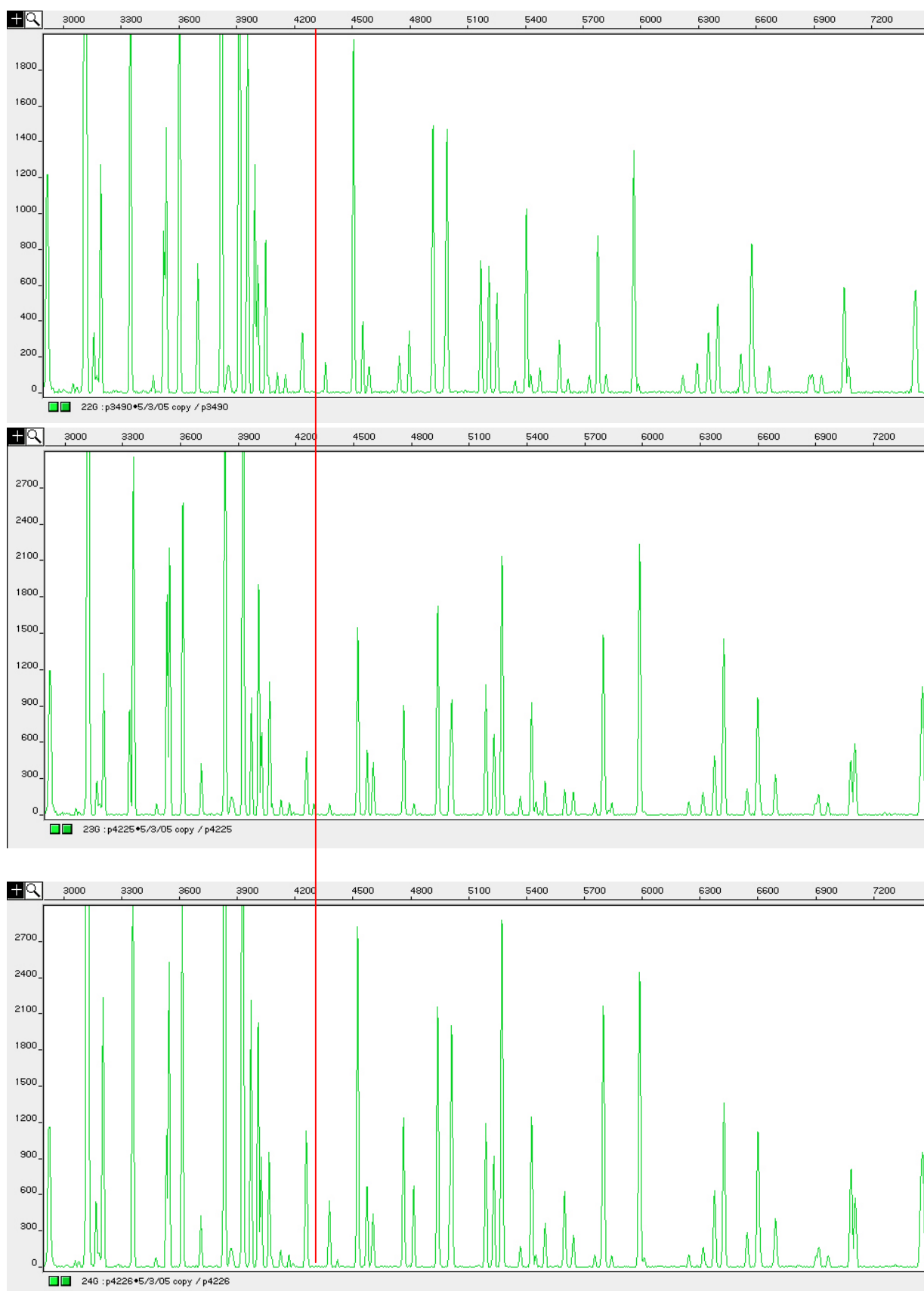


Figura 4-6. Cromatogrammi dei ceppi di *P. avellanae* NCPPB 3490, NCPPB 4225 e NCPPB 4226.
La linea rossa indica un esempio di frammenti polimorfici.
 Il dendrogramma ottenuto è riportato in Figura 4-7.

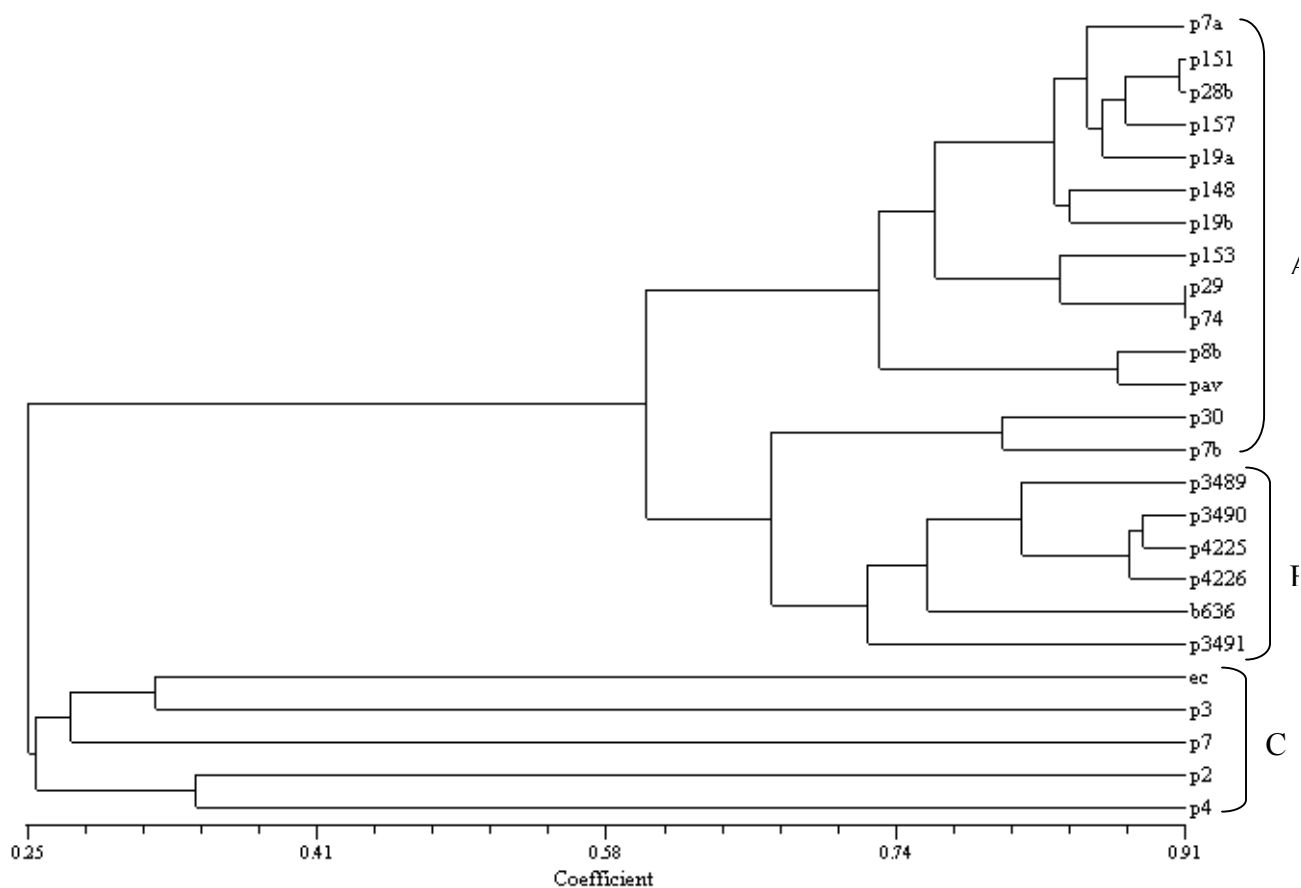


Figura 4-7. Dendrogramma basato sull'analisi dei cluster UPGMA con il programma NTSYS-PC utilizzando il fingerprinting degli AFLP ottenuto con la combinazione dei primer M2E3.

L'analisi UPGMA mostra che i ceppi clasterizzano in tre gruppi principali: il gruppo A comprende 14 isolati di *Pseudomonas* spp. isolati tutti da *C. avellana* in diversi comuni della provincia di Viterbo nel 1998, ma essi non mostrano alcuna correlazione riguardo al luogo di isolamento. Solo due di questi ceppi, p30 e p7b si discostano dal gruppo e mostrano un coefficiente di similarità più alto con il gruppo B che comprende i ceppi di *P. avellanae* isolati in Grecia. Non c'è quindi una differenza netta tra i ceppi provenienti dalla Grecia e quelli isolati nella provincia di Viterbo anche se tendono a separarsi in due gruppi distinti. Infine il gruppo C è molto distante dal gruppo A e B (25 % di similarità) e comprende il ceppo di *E. coli* utilizzato come controllo nell'analisi AFLP e gli isolati ottenuti dall'insetto *A. dispar*. Nessuna relazione esiste quindi tra i ceppi di *Pseudomonas* spp. raggruppati nel cluster A e B e quelli isolati dall'insetto raggruppati nel cluster C.

Il coefficiente di correlazione cofenetico r è stato calcolato con un test di Mantel (Mantel, 1967) comparando la matrice di valore cofenetico (ottenuta con il modulo COPH di NTSYS-pc) con la matrice iniziale di similarità, allo scopo di stimare quanto bene il dendrogramma rappresenta la sua corrispondente matrice di distanza (Rohlf, 2000). Il coefficiente di correlazione cofenetico ottenuto è stato 0,98, che indica che il dendrogramma era una eccellente rappresentazione dei dati originali.

4.4 DISCUSSIONE

L'analisi AFLP è stata utilizzata per la prima volta in questo studio per l'analisi delle relazioni tra ceppi di *P. avellanae*, isolati da piante di nocciolo provenienti da regioni differenti. Da molti anni questa tecnica è stata indicata come possibile strumento molecolare ad alta definizione e riproducibilità per la tassonomia batterica (Janssen *et al.*, 1996), e successivamente impiegata anche per la genotipizzazione di specie di *Pseudomonas* e di molti ceppi appartenenti a singole specie di *Pseudomonas*, come ad esempio *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas syzygii*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* e pv. *maculicola* (Geornaras *et al.*, 1999; Speijer *et al.*, 1999; Poussier *et al.*, 2000; Bucholm *et al.*, 2002; Pirnay *et al.*, 2003; Clerc *et al.*, 1998). Ma per lo studio di queste relazioni in *P. avellanae* in passato è stata utilizzata soltanto la REP-PCR (Scortichini *et al.*, 2000). Sebbene quest'ultima tecnica abbia consentito di individuare una sostanziale diversità genetica tra ceppi di *P. avellanae* isolati nel centro Italia e quelli isolati nel nord della Grecia e del nord Italia (0,85 di similarità), la tecnica aveva comunque un limitato potere di risoluzione nell'individuare differenze tra i ceppi isolati in territori di Comuni attigui oppure in tempi differenti.

I risultati ottenuti con la tecnica AFLP, al contrario, dimostrano che tale tecnica può essere utilizzata con successo per rivelare la variabilità genetica tra i ceppi di *P.*

avellanae isolati da piante ospiti e da territori di Comuni attigui. L'utilizzo dell'analisi delle sequenze del 16S, effettuata sempre in questo studio, non era stata in grado di stabilire queste relazioni genetiche, dimostrando ulteriormente che il potere risolutivo della tecnica AFLP è maggiore a quello dell'analisi 16S. Questo perché la tecnica AFLP tiene conto, nell'analisi dei cluster, di una buona porzione dell'intero genoma, anziché di un solo gene come per l'analisi del 16S.

Nell'analisi della variabilità genetica dei ceppi di *P. avellanae*, il risultato del dendrogramma AFLP (fig. 4-6) ha evidenziato che il raggruppamento degli isolati non era chiaramente correlato con luogo o anno di isolamento. Anche se i ceppi provenienti dalla Grecia (gruppo B) clusterizzano tutti insieme non lontano (0,72 di similarità) dai ceppi della provincia di Viterbo (gruppo A). La mancata corrispondenza tra genealogia e origine geografica non è sorprendente ed è in accordo con i risultati ottenuti in passato utilizzando altre tecniche come l'analisi del profilo proteico (Scortichini e Angelucci, 1999). Inoltre, il coefficiente di correlazione cofenetico ottenuto è stato 0.98, che indica che il dendrogramma era una eccellente rappresentazione dei dati originali.

Per quanto riguarda gli isolati di *Pseudomonas* spp. dall'insetto *A. dispar* (fig. 4-6) essi clusterizzano nel gruppo C molto distanti dai gruppi A e B (<25% di similarità), risultato che era stato predetto dall'analisi 16S. Questo risultato suggerisce che l'insetto è vettore di ceppi di *Pseudomonas* spp. differenti da quelli ritrovati nelle piante. Per confermare questa ipotesi però sarebbe necessario analizzare un numero significativo di batteri sia dall'insetto che dalla pianta.

Anche nello studio di ceppi appartenenti a generi diversi la tecnica degli AFLP si è dimostrata più sensibile rispetto all'analisi 16S. Dal confronto dei dendrogrammi ottenuti utilizzando i due differenti metodi, solo due ceppi, 7b e *P. avellanae*, clusterizzano in modo simile. Il resto dei ceppi non mostra invece un identico pattern. Soprattutto l'isolato FE29 non clusterizza più insieme ad *E. amylovora* come accadeva per l'analisi 16S, e nell'analisi AFLP tra i due esiste un coefficiente di similarità <15%. In questo modo è stato possibile chiarire la posizione tassonomica dell'isolato FE29 che con un'altissima probabilità appartiene alla famiglia delle Enterobatteriacee, ma ulteriori studi sono necessari per determinare se si tratta di una nuova specie appartenente al genere *Erwinia*.

In questo studio sono state selezionate sette combinazioni di primer con un nucleotide selettivo, in quanto essi producono dei fingerprinting significativi per differenziare le specie putativamente coinvolte nella “moria” del nocciolo. Le matrici di similarità genetica ottenute utilizzando diverse combinazioni dei primer erano altamente e significativamente correlate (i valori di r erano compresi tra 0,86 e 0,92). Questo significa che le varie combinazioni di primer danno una stima comparabile della similarità genetica lungo gli alberi ottenuti.

Il grado di correlazione tra le matrici di similarità genetica generate con differenti combinazioni di primer è stato misurato utilizzando il test di Mantel con il programma NTSYS-PC versione 1,60 (Rohlf, 1990). Tutti i valori di r erano compresi tra 0,86 e 0,92 indicando una buona correlazione tra di esse.

CAPITOLO 5 SVILUPPO DI MARCATORI SCAR DA FRAMMENTI AFLP

5.1 I marcatori SCAR (Sequence characterized amplified regions)

La tecnica degli AFLP (Amplified fragment length polymorphism) è una tecnica di fingerprinting basata sulla PCR, molto efficiente nel determinare polimorfismi nel DNA. I vantaggi degli AFLP sono l'alta riproducibilità (Jones *et al.*, 1997), la disponibilità per ogni complessità di genoma, la possibilità di generare un virtuale infinito numero di marcatori e il fatto che non sono richieste precedenti informazioni sulla sequenza. Questo è dimostrato dai più di 1200 lavori nei quali la tecnologia degli AFLP è stata utilizzata per tutti i tipi di applicazione quali l'analisi della diversità genetica, costruzione di mappe genetiche in funghi (Majer *et al.*, 1996), insetti (Yan *et al.*, 1999), piante (Becker *et al.*, 1995) e animali (Ransom e Zon, 1999).

I marcatori AFLP però sono meno adatti solo per il saggio di singoli loci (ad es. studi della frequenza degli alleli, clonaggio basato sulle mappe genetiche). Sebbene marcatori AFLP possono essere utilizzati per queste applicazioni (Liu *et al.*, 1998),

molti marcatori sono troppo costosi e troppo laboriosi per lo screening su larga scala di singoli loci. Di qui ne deriva la forte necessità di convertire marcatori AFLP in singoli marcatori PCR come ad esempio CAPS (cleaved amplified polymorphic site) o SCAR (sequence characterised amplified region) (Paran e Michelmore, 1993) perché questi marcatori sono più facili da utilizzare e meno costosi per saggiare singoli loci.

Per questo motivo è molto importante avere un protocollo di conversione dei marcatori AFLP in marcatori PCR molto affidabile ed efficiente. Sebbene la conversione sia tecnicamente semplice si possono incontrare alcune difficoltà. Il primo ostacolo riguarda l'estrazione di un frammento AFLP dal gel. Spesso il frammento estratto contiene frammenti multipli che sono il risultato del coisolamento di più frammenti di amplificazione (Meksem *et al.*, 2001). Il secondo ostacolo è relativo alla piccola dimensione delle bande AFLP. La risultante sequenza di DNA è spesso troppo corta per disegnare dei primer ottimali per la PCR (Bradeen e Simon, 1998). Questi problemi spesso riducono l'efficienza dei protocolli così che solo una piccola parte di marcatori AFLP può essere convertita in modo efficiente in marcatori per PCR per il saggio di singoli loci (Brugmans *et al.*, 2003).

Il termine SCAR fu introdotto per la prima volta da Paran e Michelmore (1993) per indicare quella tecnica in cui marcatori RAPD sono sequenziati e su queste sequenze vengono disegnati primer per l'amplificazione specifica di un particolare locus. Questi marcatori sono simili ai marker STS sia per il modo in cui vengono costruiti sia per l'applicazione. Possono essere ottenuti anche a partire dagli AFLP.

I passaggi per ottenere i marcatori SCAR sono i seguenti (Figura 5-1):

- una banda di interesse viene individuata in un gel RAPD o AFLP
- la banda viene tagliata dal gel
- i frammenti di DNA vengono clonati in un vettore e sequenziati
- vengono disegnati primer specifici (lunghe 16-24 pb) per quel frammento di DNA
- la riamplicazione del DNA con i nuovi primer mostrerà un nuovo e semplice pattern PCR.

Diagramma della procedura SCAR

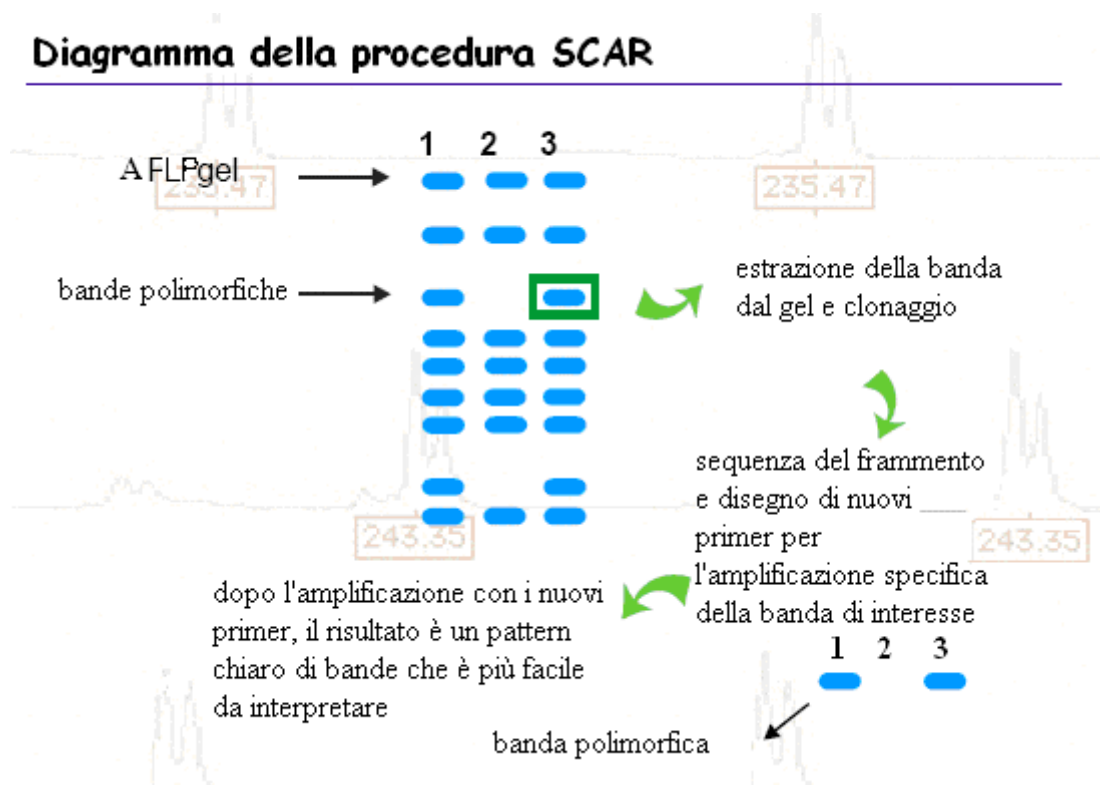


Figura 5-1. Passaggi per ottenere marcatori SCAR

I vantaggi degli SCAR sono i seguenti: producono un pattern più semplice rispetto ai RAPD o agli AFLP, sono un saggio robusto perché vengono disegnati dei primer più lunghi rispetto a quelli utilizzati per esempio nell'amplificazione degli AFLP, sono marcatori dominanti, ma possono essere convertiti in marcatori codominanti digerendoli con enzimi di restrizione e ottenendo il polimorfismo mediante elettroforesi su gel. Come gli AFLP impiegano la PCR per ottenere i dati e richiedono piccole quantità di DNA.

5.2 Materiali e Metodi

5.2.1 Metaphore agarose

I frammenti AFLP sono stati caricati su un gel al 2% di metaphore agarose per potere estrarre le bande polimorfiche.

Il gel metaphore è stato preparato come segue:

1. Si sceglie un beaker che sia 2-4 volte il volume della soluzione
2. Si pesa 1g di Metaphor® agarose per un gel da 50 ml
3. Si aggiungono 50 mL di TBE buffer 1X freddo e un magnetino nel beaker
4. Lentamente si aggiunge la polvere di agarosio mentre la soluzione è in agitazione
5. Si pesano il beaker e la soluzione prima di riscaldare
6. Si copre il beaker con del parafilm
7. Si fa un piccolo buco nel parafilm per la ventilazione
8. Si scalda il beaker sulla piastra finchè non arriva all'ebollizione
9. Si lascia in ebollizione finchè l'agarosio non è dissolto (circa 10 minuti)
10. Dopo la dissoluzione, si aggiunge sufficiente acqua calda distillata per ottenere il peso iniziale
11. Si mescola completamente
12. Si raffredda la soluzione a 50-60°C , si aggiungono 3 µL EtBr prima di colarlo
13. Una volta che il gel è colato, si lascia a temperature ambiente
14. Infine si mette il gel a 4°C per 20 minuti

Sono stati aggiunti 1,5 µl di blu a 10 µl di prodotto dell'amplificazione selettiva e sono stati caricati sul gel. Il gel è corso a 140V per 2,5 ore.

5.2.2 Estrazione del DNA dal gel metaphore

Protocollo standard

- I frammenti di DNA di interesse sono stati escissi dal gel con una lama pulita. Solo il gel contenente il frammento è stato escisso per minimizzare il volume del gel. Dopo aver pesato il gel, è stato trasferito in un eppendorf sterile.
- Per ogni 100 mg di gel si aggiungono 300 µl di soluzione NT1. La massima quantità di gel per ogni colonnina di estrazione è 400 mg oppure 200 mg se il gel ha una percentuale più alta del 2%.
- I campioni sono stati incubati a 50°C fino alla dissoluzione del gel (10 min). I tubi sono stati agitati con un vortex ogni 2-3 minuti.
- I campioni sono stati caricati su una colonna Nucleospin extract posta in un tubo di raccolta da 2 ml.
- Sono stati centrifugati per 1 min a 9000g. Si scarica il liquido e si ripone la colonnina nel tubo.
- Si aggiungono 500 µl di buffer NT2 sulla membrana. Si centrifuga per 10 min a 18000g e si scarica il liquido.
- Si aggiungono 600 µl di buffer NT3. Si centrifuga per 1 min a 18000g. Si scarica il liquido e si ripone la colonnina nel tubo.
- Si aggiungono 200 µl di buffer NT3. Si centrifuga per 3 min. a 18000g per rimuovere l'NT3.
- La totale rimozione dell'NT3 è ottenuta incubando la colonnina per 2-5 min. a 70 °C prima della eluizione.
- La colonnina Nucleospin extract viene posta in un eppendorf sterile da 1,5 ml e vengono aggiunti 20 µl di buffer NE. Si lascia incubare a T ambiente per 1 min. per incrementare la resa del DNA. Si centrifuga per 1 min. a massima velocità e si ripetono gli ultimi due passaggi aggiungendo altri 20 µl di NE buffer.

2 µl di questo DNA estratto da gel sono stati riamplicati utilizzando gli stessi primer dell'amplificazione selettiva con lo stesso profilo finale. 5 µl di prodotto PCR sono stati caricati su un gel metaphore al 2% per verificare la presenza delle bande. I

frammenti di interesse sono stati clonati in cellule di *Escherichia coli* utilizzando il kit della PROMEGA.

5.2.3 Clonaggio dei prodotti PCR utilizzando il kit PROMEGA

Protocollo standard

Nel kit di clonaggio pGEM-T easy vector della PROMEGA i vettori vengono preparati tagliandoli con l'enzima EcoRV ed aggiungendo timidina ad entrambe le estremità. Queste code di timina al sito di inserzione incrementano l'efficienza della ligazione del prodotto PCR nel plasmide prevenendo la ricircularizzazione del vettore e fornendo un vettore adatto ai prodotti PCR generati dalla Taq polimerasi. Queste polimerasi infatti aggiungono spesso una singola deossiadenosina al terminale 3' dei frammenti amplificati.

I. A-TAILING

- Si aggiunge 1 µl di Reaction buffer 10X contenente MgCl₂ a 7 µl di prodotto PCR purificato
- Si aggiunge dATP fino alla concentrazione finale di 0,2 µM
- Si aggiungono 5 unità di TAQ polimerasi
- Si aggiunge acqua deionizzata fino al volume di 10 µl
- Si lascia incubare a 70°C per 15-30 min
- Si utilizzano 2 µl di questa reazione per la reazione di ligazione.

II. LIGAZIONE

Si prepara la seguente master mix:

2X Rapid Ligation buffer T4 DNA ligasi	5 µl
pGEM easy vector	1 µl
Prodotto PCR	3 µl
T4 DNA ligasi	1 µl
TOT 10 µl	

Si lascia incubare a 24°C per 1 ora oppure a 4°C per tutta la notte. Con quest'ultimo metodo si produrranno il massimo numero di trasformanti.

III. CLONAGGIO

- Si centrifugano brevemente i tubi contenenti la reazione di ligazione.
- Si aggiungono 2 µl di questa reazione in un eppendorf sterile posto in ghiaccio.
- Si tolgono le cellule di *E. coli* competenti dal -80°C e si lasciano sciogliere in ghiaccio.
- Si trasferiscono 50 µl di cellule negli eppendorf contenenti la reazione di legazione.
- Si agitano delicatamente i tubi e si lasciano in ghiaccio per 20 min. Più lunghe incubazioni in ghiaccio non sembrano avere alcun effetto sulla efficienza di trasformazione.
- Le cellule sono state sottoposte a “heat-shock” per 45 sec. a 42°C senza mescolare.
- Immediatamente i tubi sono rimessi in ghiaccio per 2 min.
- Si aggiungono 950 µl SOC medium a temperatura ambiente.
- Si fa incubare per 1,5 h a 37°C in un agitatore orizzontale a 150 rpm.
- Per ogni trasformazione si piastrano 100 µl e 50 µl di volume di cellule trasformate su piastre di LB (Luria- Bertani) solido contenenti 50 µg/ml di ampicillina.
- Si fanno incubare le piastre per 12 ore a 37°C.

5.2.4 Selezione ed isolamento dei cloni positivi

Il giorno successivo le singole colonie cresciute sono prelevate con uno stecchino sterile, ripiastrate separatamente e incubate a 37°C per tutta la notte, per aumentare la quantità di cellule.

Il giorno seguente le colonie sono di nuovo prelevate con uno stecchino sterile e immerse in tubi contenenti 10 µl di acqua distillata. Sono bollite a 99°C per 10 min. I

plasmidi liberati dalle cellule lisate sono stati utilizzati come template per una reazione PCR con primer universali M13F (forward) e M13R (reverse) (INVITROGEN) utilizzando 1 μ M di ciascun primer in una reazione PCR da 25 μ l per valutare sia l'inserzione sia la dimensione del frammento PCR. Le condizioni di reazione erano le seguenti: una denaturazione iniziale a 94°C per 2 min., poi 25 cicli con denaturazione a 94°C per 1 min., amplificazione a 55°C per 1 min., estensione a 72°C per 1 min., e infine una estensione a 72°C per 7 min., blocco della reazione con raffreddamento a 4°C. Per ogni gene sono state analizzate circa 20-25 colonie e il plasmide corretto è stato estratto con il kit Minipreps DNA Purification System della PROMEGA.

5.2.5 Estrazione del plasmide

Protocollo standard

PRODUZIONE DI UN LISATO CHIARO

- 1.5 μ l di sospensione cellulare viene centrifugato per 5 min. a 18000g.
- Si aggiungono 250 μ l di Cell Resuspension Solution.
- Si aggiungono 250 μ l di Cell Lysis Solution. Si invertono i tubi per 4 volte.
- Si aggiungono 10 μ l di Alkaline Protease solution. Si invertono i tubi 4 volte. Si fa incubare per 5 min. a temperatura ambiente.
- Si aggiungono 350 μ l di Neutralization solution; si invertono i tubi 4 volte.
- Si centrifuga per 10 min a 18000g a temperatura ambiente.

LEGAME DEL DNA PLASMIDICO

- Si inseriscono le Spin column nei Collection tube.
- Si carica il surnatante sulle Spin column.
- Si centrifuga per 1 minuto a temperatura ambiente

LAVAGGIO

- Si aggiungono 750 μ l di Wash Solution. Si centrifuga per 1 min a 18000g; si scarica il lisato e si rinseriscono le colonnine nei Collection Tube.
- Si ripete il passaggio precedente con 250 μ l di Wash solution.
- Si centrifuga per 2 min. a 18000g per 2 min.

ELUIZIONE

- Si trasferiscono le colonnine in eppendorf da 1,5 ml sterili

- Si aggiungono 100 µl di Nucleare-Free Water e si centrifuga a 18000g per 1 min.
- Si conserva il DNA fluído a -20°C.

5.2.6 Preparazione dei campioni per il sequenziatore

15 ng di DNA sono stati utilizzati per ogni 100 pb del frammento da sequenziare con 3.2 pmol di primer M13 e acqua per PCR fino a raggiungere il volume di 7 µl. I campioni sono stati sequenziati utilizzando il Big Dye Terminator v 1.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems), utilizzando il sequenziatore ABI PRISM 310 (Applied Biosystem).

5.2.7 Disegno dei primer SCAR

Sulle sequenze ottenute sono stati disegnate due coppie di primer utilizzando il programma Oligo Analyzer 3.0 (<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/Default.aspx>).

Di seguito in rosso sono riportate le sequenze dei primer utilizzati nell'amplificazione selettiva con in blu il nucleotide selettivo utilizzato. Le sequenze dei marker SCAR sono sottolineate.

Frammento di 294 pb:

CGATTGATGAGTCCTGAGTAACCTGCAGCTTGCCTATGATCTGCGCAAGGCA
GAGACAGAGAAGGGCGCGCAGATTCGTGAGCAGGTCAAATGTCTGGCCCAC
TGCGGCTGATAACTGTCACCCGTCAGTGCAGTCAATGAGCCCTTATCCAGCC
TTTCAGACTCAGCCTTCTCAGCCCCACCGAGCTTGCCTTCCAGCTCGGCCAT
CTTGGCCTCCAGCGCCTCGAGGGCGGGCACGGGTGCGGGCGAGGACGGCCAT
CTGGCTGTGGAACCTCTTCGCGGCTGACCAGGTCCAGTTTGCTGAAACCGCTT
TGCAGCAGTGCTTTGAACTGGGTTTGAATTGGTACGCAGT

La sequenza dei marker SCAR era la seguente:

SCAR294F (Forward): CGC AAG GCA GAG ACA GAG A Tm: 60°C

SCAR294R (Reverse): CGA AAC CCA GTT CAA AGC AC Tm: 60°C

Frammento di 249pb:

CGATTGATGAGTCCTGAGTAACTAGGGGGCGGTCAAATGGCACCCCTGAGTT
TGTCCGTCGCAGCGCCCGCGCAGGTATTTCAATAGCGTGCGGATAAGCCTA
AAGTCCTGATCACGGCCGGCTGCAAATAGCCTACTCTTGAATGCCTCCTGCC
CACTACCCGACTGCAGAATCGACACAGACTCCCTCACAACAAGAACCAGGA
GACATAACCATGCGTTACGCTCATCCCGGTACCGAAGGCGCTATCGTCAACTT
CAAGGAACGCTACGGTAACTACATTGGCGGCGAGTTCGTCGCGCCCGTCAA
AGGTCAGTATTTACCAACACCTCGCCCGTCAACGGCAAGCCCATCGCCTGA
ATTGGTACGCAGT

La sequenza dei marker SCAR era la seguente:

SCAR249F (Forward): TCA ATA GCG TGC GGA TAA GC Tm: 60 °C

SCAR249R (Reverse): 5'- GGT CAG TAT TTC ACC AAC A -3' Tm: 54 °C

5.2.8 PCR con i primer SCAR

La PCR con i marker SCAR è stata effettuata in un volume di 20 µl contenenti 100 ng di DNA genomico, 0.25 µM di ciascun primer, 1 unità di Taq di DNA polimerasi, 0.2 mM di ciascun dNTP, 1.5 mM MgCl₂, 1X di PCR buffer. La PCR è stata effettuata nel 2400 Thermocycler (Perkin Elmer-Applied Biosystems, Warrington, UK) con il seguente programma per entrambi i marker SCAR: un ciclo di denaturazione iniziale a 94°C per 3 minuti, una denaturazione a 94°C per 1 minuto, una amplificazione a 60°C per 1 minuto, una estensione a 72°C per 1 minuto, ripetuti per 30 cicli, una estensione finale a 72°C per 5 minuti e infine il raffreddamento a 4°C.

Tutti i prodotti dell'amplificazione sono stati analizzati su un gel all'1.2% di agarosio (Agarose MP, Roche) utilizzando il tampone TBE contenente 0.1 µg/ml di bromuro di etidio. Il DNA è stato visualizzato ponendo direttamente il gel sotto un transilluminatore UV. La foto è stata ottenuta con il programma KODAK 1D con una fotocamera digitale DC 290.

5.3 RISULTATI

Dall'analisi dei frammenti AFLP ottenuti con la coppia di primer Mse-C Eco-G caricati su gel al 2% di metaphore agarose (Fig. 5-2) sono state scelte solo quelle bande che erano specifiche per *P. avellanae*. Tutte queste bande sono state tagliate dal gel, clonate e sequenziate.

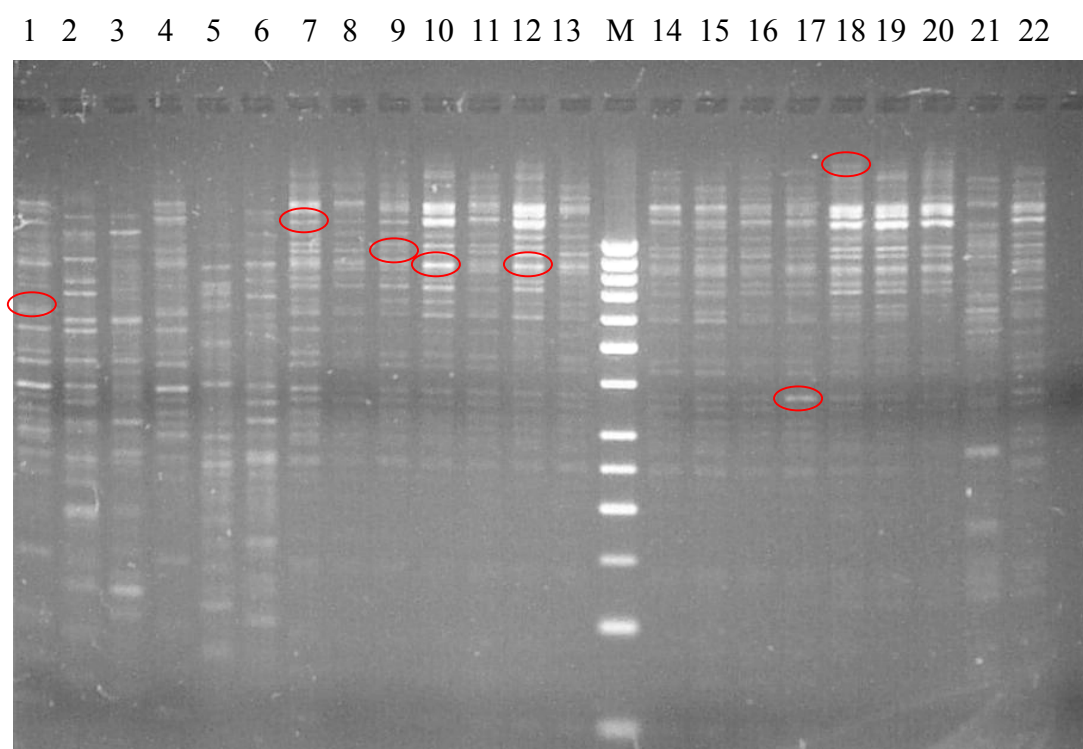


Figura 5-2. Frammenti AFLP caricati su un gel al 2% di metaphore agarose. Linea 1, *Pseudomonas avellanae* NCPPB 3872; linea 2, *Erwinia amylovora* NCPPB 1734; linea 3, *Brenneria quercina* NCPPB 1852; linea 4, 7b; linea 5, *Brenneria nigrifluens* ATCC 29275; linea 6, *Brenneria rubrifaciens* NCPPB 2021; linea 7, 153; linea 8, 29; linea 9, 74; linea 10, 7a ; linea 11, 19b; linea 12, 30; linea 13, 151; linea 14, 19a; linea 15, 148; linea 16, 8b; linea 17, 157; linea 18, *P. avellanae* NCPPB 3489; linea 19, *P. avellanae* NCPPB 3490; linea 20, *P. avellanae* NCPPB 3491; linea 21, *P. avellanae* 3; linea 22, *P. avellanae* BPIC 636; linea 23, *Escherichia coli*; linea M, marker 50bp.

Le sette bande purificate dall'agarosio sono state riamplicate con gli stessi primer utilizzati nell'amplificazione selettiva.

Il risultato dell'amplificazione è riportato in Figura 5-3.

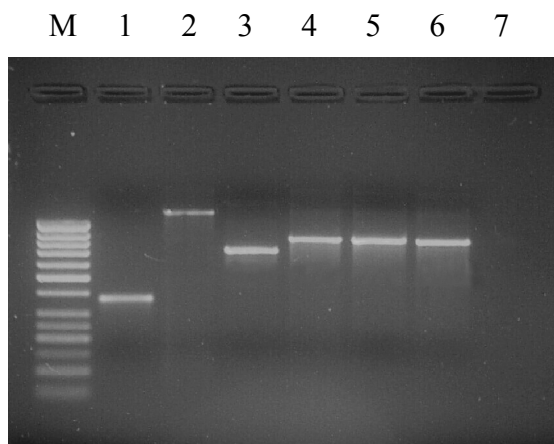


Figura 5-3. Frammenti tagliati dal gel e riamplicati con i primer Mse-C Eco-G. Linea M, marker 50bp.

Una volta amplificati, i frammenti sono stati clonati in *E. coli*. Dal clonaggio sono stati ottenuti solo i plasmidi che avevano incorporato il frammento 1. Per questo frammento 10 cloni sono stati selezionati casualmente e sequenziati (Figura 5-4).

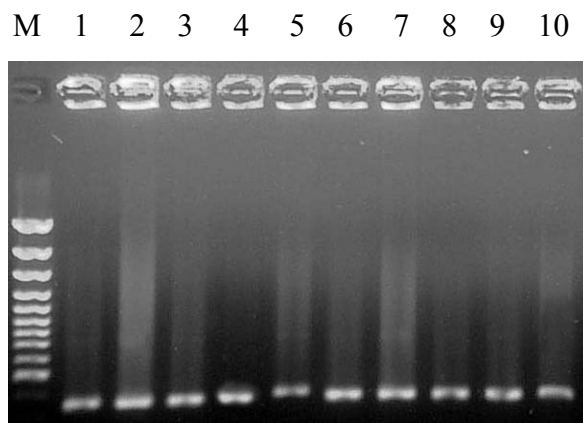


Figura 5-4. Cloni riamplicati con i primer Mse-C Eco-G. Linea M: marker

Le dieci sequenze sono state classificate in due gruppi, uno contenente sei sequenze e uno contenente quattro sequenze. Tutte le sequenze degli inserti contenevano un primer EcoRI da un lato e un primer MseI dall'altro, indicando che questi frammenti sono stati amplificati da una combinazione di primer EcoRI e MseI. Tutte le sequenze ottenute sono state sottoposte alla ricerca di omologia con il programma BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

La sequenza del primo gruppo ha dato allineamento solo con un gene in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* che codifica per una proteina associata alla virulenza

[gij28856110|gb|AE016853.1](#) *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* str. DC3000 complete genome

Features in this part of subject sequence:

virulence-associated protein, putative
conserved hypothetical protein

Score = 500 bits (252), Expect = 1e-139
Identities = 307/324 (94%), Gaps = 1/324 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query	19	TAACCTGCAGCTTGCCTATGATCTGCGCAAGGCAGAGACAGAGAAGGGCGCGCAGATTCTG 	78
Sbjct	239526	TAACCTGCAGCTTGCCTACGATCTGCGCAAGGCAGAGACAGAGAAGGGCGCGCAGATTCTG 	239585
Query	79	TGAGCAGGTCAAATGTCTGGCCCACTGCGGCTGATAACTGTCACCCGTCTAGTGCAGTCAA 	138
Sbjct	239586	TGAGCAGGTCAAATGTCTGGCCCACTGCGCTTGATAACTGTCACCCGTCTAGCGCAGTCAA 	239645
Query	139	TGAGCCCTTATCCAGCCTTT-CAGACTCAGCCTTCTCAGCCCCACCGAGCTTGCCTTCCA 	197
Sbjct	239646	TGAGCCCTTATTTCAGCCTTTTCAGAGCCAGCCTTCTCAGCCCCGCCGACCTTACCTTCCA 	239705
Query	198	GCTCGGCCATCTTGGCCTCCAGCGCCTCGAGGCGGGCACGGGTGCGGGCGAGGACGGCCA 	257
Sbjct	239706	GCTCGGCCATCTTGGCCTCCAGCGCCTCAAGGCGGGCACGGGTGCGGGCGAGGACGGCCA 	239765
Query	258	TCTGGCTGTGCAACTCTTCGCGGCTGACCAGGTCCAGTTTGCTGAAACCGCTTTGCAGCA 	317
Sbjct	239766	TCTGGCTGTGCAATTCTTCGCGACTGACCAGGTCCAGCTTACTGAAACCGCTTTGCAGCA 	239825
Query	318	GTGCTTTGAACTGGGTTTTCGAATT 	341
Sbjct	239826	GGGCTTTGAACTGGGTTTTCGAATT 	239849

La sequenza del secondo gruppo invece ha mostrato omologia in più specie con il gene aldehyde dehydrogenase (NAD+).

gi|28856110|gb|AE016853.1|  **Pseudomonas syringae** pv. tomato str. DC3000 complete menome
Features in this part of subject sequence:
aldehyde dehydrogenase family protein

Score = 488 bits (246), Expect = 6e-135
Identities = 264/270 (97%), Gaps = 0/270 (0%)
Strand=Plus/Minus

```

Query 93      GATAAGCCTAAAGTCCTGATCACGGCCGGCTGCAAATAGCCTACTCTTGAATGCCTCCTG 152
              |||
Sbjct 778823  GATAAGCCTAAAGTCCTGATCACGGCCGGTTGCAAATAGCCTAATCTTGAATGCTTGCTG
778764

Query 153     CCCACTACCCGACTGCAGAATCGACACAGACTCCCTCACAACAAGAACCAGGAGACATAC 212
              |||
Sbjct 778763  CCCACTACCCGACTGCAGAATCGACACAGACTCCCTCACAACAAGAACCAGGAGACATAC
778704

Query 213     CATGCGTTACGCTCATCCCGGTACCGAAGGCGCTATCGTCAACTTCAAGGAACGCTACGG 272
              |||
Sbjct 778703  CATGCGTTACGCTCATCCCGGTACCGAAGGCGCTATCGTCAACTTCAAGGAACGCTACGG
778644

Query 273     TAACTACATTGGCGGCGAGTTCGTCGCGCCCGTCAAAGGTCAGTATTTACCAACACCTC 332
              |||
Sbjct 778643  TAACTACATTGGCGGCGAGTTCGTCGCTCCGGTCAAAGGTCAGTATTTACCAACACCTC
778584

Query 333     GCCCGTCAACGGCAAGCCCATCGCCGAATT 362
              |||
Sbjct 778583  GCCCGTCAACGGCAAGCCCATCGCCGAATT 778554

```

Su entrambe queste sequenze sono stati costruiti i primer SCAR. I primer SCAR294F-SCAR 294R sono stati costruiti sulla sequenza del primo gruppo e amplificano un frammento di 294pb; i primer SCAR 250F- SCAR 250R sono stati costruiti sulla sequenza del secondo gruppo e amplificano un frammento di 249 pb.

Le sequenze dei frammenti e dei primer sono riportati in materiali e metodi (par.5.2.7).

Le due coppie di primer sono state testate in PCR per verificare la loro specificità per le colonie di *P. avellanae*. In Figura 5-5 è riportato il risultato dell'amplificazione. Tutti i ceppi di *P. avellanae* hanno prodotto un amplificato. Nessun prodotto è stato ottenuto dal controllo con acqua, dai ceppi di *Brenneria* spp. e da *E. amylovora*.

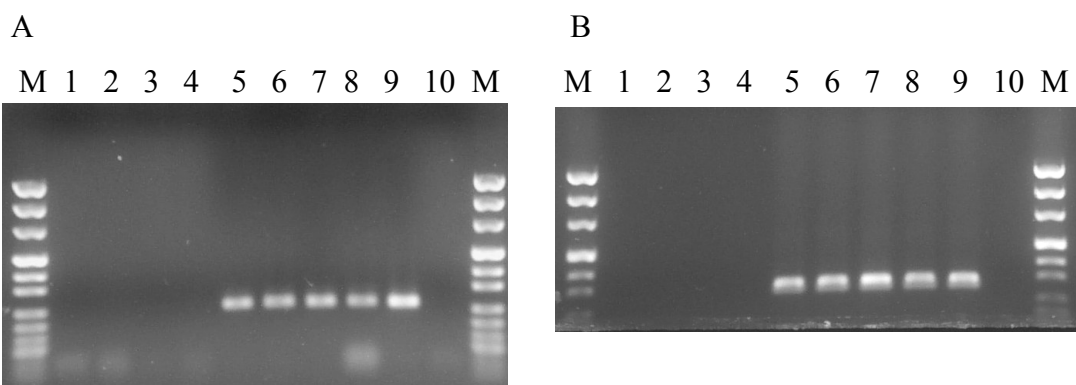


Figura 5-5: Pattern di bande ottenuto in PCR con i primer SCAR 250 (A) e SCAR 294 (B). Linea 1, *Erwinia amylovora* NCPPB 1734, linea 2, *Brenneria quercina* NCPPB 1852, linea 3, *Brenneria rubrifaciens* NCPPB 2021, linea 4, *Brenneria nigrifluens* ATCC 29275, linea 5, *Pseudomonas avellanae* 153, linea 6, *Pseudomonas avellanae* 19 a, linea 7, *Pseudomonas avellanae* 157, linea 8, *Pseudomonas avellanae* BPIC 636, linea 9, *Pseudomonas avellanae* NCPPB 4226, linea 10, controllo negativo, linea M, marker 8.

Le PCR sono state ripetute tre volte per verificare la ripetibilità dei risultati.

I primer SCAR 250 sono stati testati anche su ceppi di *P. avellanae* provenienti da province diverse (Figura 5-6). Tutti i ceppi di *P. avellanae*, sia quelli isolati nella provincia di Viterbo che quelli isolati in Grecia, hanno prodotto un amplificato. Nessun amplificato è stato ottenuto per i ceppi di *P. syringae* malgrado l'alta identità di sequenza dei loro genomi.

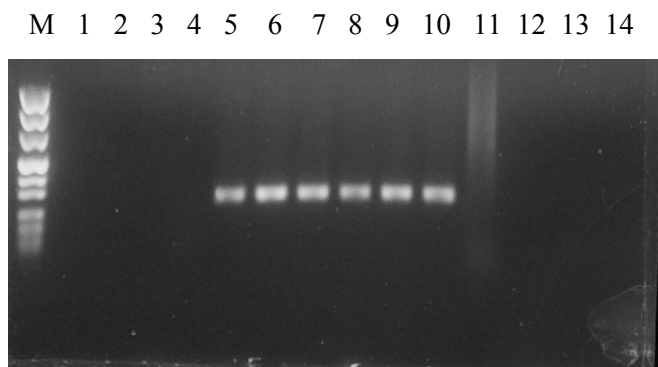


Figura 5-6. Pattern di bande ottenuto con i primer SCAR250. Linea 1: *B. nigrifluens*; linea 2: *B. quercina*; linea 3: *B. rubrifaciens*; linea 4: *E. amylovaora*; linea 5: 153; linea 6: 19a; linea 7: 157; linea 8: NCPPB 4225; linea 9: NCPPB 4226; linea 10: NCPPB 3489; linea 11: *P. syringae*; linea 12: *P. syringae*; linea 13: *E. coli*; linea 14: controllo negativo.

Infine i primer SCAR250 sono stati utilizzati per verificare la presenza di *P. avellanae* tra gli isolati dall'interno/esterno dell'insetto *A. dispar*. Il risultato dell'amplificazione è riportato in Figura 5-6.

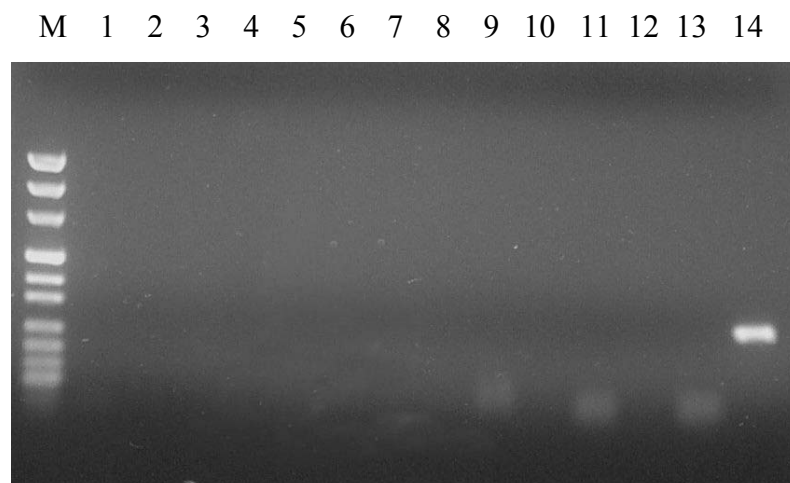


Figura 5-6. Risultato dell'amplificazione ottenuto con i primer SCAR250F e SCAR250R. Linea1: 17.5.04 VS INTA; linea2: 2.5.05 SEXTA; linea3: 16.5.05 BOSCOINTA; linea4: 26.4.04 MEXTC; linea5: 6.4.04 VSINTB; linea6: 10.5.04 VMINTA; linea7: 22.3.04 MEXTA; linea8: 4.4.05 SEXTA; linea9: 18.4.05 VMEXTC; linea10: 21.3.05 VMEXTB; linea11: 6.6.05 VSINTA; linea12: 26.4.05 SEXTA; linea13: controllo negativo; linea14: *Pseudomonas avellanae* NCPPB 3872.

Nessun amplificato è stato ottenuto per i ceppi isolati dall'insetto. Solo il controllo positivo ha dato la banda attesa di 240 pb.

5.4 DISCUSSIONE

I frammenti polimorfici individuati con l'analisi AFLP sono stati convertiti in marcatori SCAR, al fine di incrementare la loro facilità di impiego, ridurre i costi e predisporre un loro utilizzo come singoli loci in un sistema diagnostico.

Per ottenere i marcatori SCAR è stato necessario mettere a punto una serie di aspetti tecnici. Anzitutto il volume del gel tagliato è stato minimizzato per evitare il coisolamento di più bande. Il frammento purificato è stato poi riamplicato con gli stessi primer utilizzati nell'amplificazione selettiva per verificare la loro riproducibilità. Dal clonaggio sono risultati positivi solamente i cloni che avevano incorporato il frammento di 350 pb (frammento 1, fig. 5-3), perché per le sue ridotte dimensioni gli permettono di competere per i siti di legame del plasmide meglio degli altri frammenti di maggiori dimensioni. Per questo frammento sono stati selezionati 10 cloni che sono stati sequenziati ed allineati, per verificare l'omologia di sequenza. Sulle sequenze risultanti sono stati disegnati due diverse coppie di primer che, una volta testate sul DNA di diversi ceppi di *Pseudomonas* spp., si sono rivelate molto specifiche ed affidabili. La reazione di amplificazione, infatti, permette di ottenere una sola banda a differenza di quanto si ottiene impiegando i primer WA e WC (Loreti e Galleli, 2002). Questi primer, ogni qualvolta siano stati impiegati, hanno generato più di un prodotto di amplificazione. Un'analisi attenta delle figure riportate nell'articolo degli autori menzionati evidenzia la presenza di più di una banda, indicando che la specificità del marcatore è legato, più che all'esclusività dell'amplificazione, alla dimensione della banda amplificata. I primer ottenuti sulle regioni geniche individuate, in questo lavoro, al contrario, identificano qualitativamente il marcatore molecolare, esclusivamente per *P. avellanae*.

L'amplificazione di diversi isolati di *Pseudomonas* spp. dall'insetto con uno di questi primer ha consentito di escludere, con un'elevata attendibilità, la possibilità che l'insetto veicoli questo batterio all'interno della pianta. Poiché i batteri isolati dall'anisandro potrebbero essere solamente rappresentativi e non comprensivi dell'insieme dei possibili batteri associati ad esso, prove condotte sul DNA estratto dall'insetto interamente macinato potrebbero escludere definitivamente che esso sia il

vettore del batterio. Tuttavia, prima di condurre questo test bisognerebbe invalidare la possibilità che i primer non amplifichino regioni omologhe del DNA dell'insetto.

CAPITOLO 6 CONCLUSIONI

L'analisi di sequenza del gene 16S rRNA è stata utilizzata per identificare e classificare i batteri isolati da piante di nocciolo sintomatiche, posti in diversi comuni della provincia di Viterbo, e dall'interno/esterno dell'insetto *Anisandrus dispar*, probabile vettore del patogeno. L'analisi ha consentito di dare una prima indicazione di quali batteri fossero supposti patogeni e inducenti la "moria". Una volta definite le relazioni genetiche tra i batteri isolati e quelli potenzialmente coinvolti nella "moria" indicati in letteratura, sono state studiate le relazioni intrageneriche e intergeneriche, confrontando i marcatori molecolari ottenuti da due diverse metodiche: analisi delle mutazioni del gene ribosomiale 16S e la tecnica AFLP.

L'analisi del 16S rRNA si è rivelata efficace nell'individuare le relazioni tra specie appartenenti a generi diversi, come ad esempio le specie appartenenti al genere *Brenneria*, ma l'analisi degli AFLP è risultata più sensibile. Dal confronto infatti dei dendrogrammi ottenuti utilizzando i due differenti metodi, solo due isolati, 7b e *P. avellanae* NCPPB 3872, clusterizzano in modo simile. Il resto dei ceppi non clusterizza con un identico pattern. Soprattutto l'isolato FE29 non clusterizza più insieme ad *E. amylovora*, come accadeva per l'analisi 16S, e nell'analisi AFLP tra i due esiste un coefficiente di similarità <15%.

L'analisi AFLP è stata anche utilizzata per lo studio delle relazioni tra ceppi di *P. avellanae*, isolati da piante di nocciolo provenienti da paesi differenti. L'analisi delle sequenze del 16S, non era stata in grado di stabilire delle relazioni genetiche. Il risultato del dendrogramma AFLP, pur non evidenziando correlazioni tra i batteri isolati e luogo ed anno di isolamento, ha separato i ceppi provenienti dalla Grecia (gruppo B) che clusterizzano tutti insieme dai ceppi della provincia di Viterbo (gruppo A), con lo 0,72 di similarità.

Per quanto riguarda gli isolati di *Pseudomonas* spp. dall'insetto *A. dispar* essi clusterizzano nel gruppo C molto distanti dai gruppi A e B (<25% di similarità), risultato che era stato anche predetto dall'analisi 16S. Questo suggerisce che l'insetto è vettore di specie di *Pseudomonas* spp. differenti da quelli ritrovati nelle piante.

Infine, sono stati sviluppati marcatori SCAR a partire dai frammenti polimorfi AFLP, al fine di ottenere primer specifici per la caratterizzazione di *P. avellanae*. Questi primer, una volta testati sul DNA di diversi ceppi di *Pseudomonas* spp., si sono rivelati altamente specifici ed affidabili. Dalla reazione di amplificazione, infatti, si ottiene una sola banda a differenza di quanto avviene con l'impiego dei primer WA e WC che generano più di un prodotto di amplificazione. L'amplificazione di diversi ceppi di *Pseudomonas* spp. isolati dall'insetto con una coppia di questi primer SCAR, ha consentito di escludere, con un'elevata attendibilità, la possibilità che l'insetto veicoli *P. avellanae* nella pianta.

CAPITOLO 6 Bibliografia:

Aloj, B., D'errico, F., Olmi, M., Paparatti, B., Ragazzino, A., Tombesi, A., Varvaro, L. (1994) "Moria del nocciolo" dei Colli Cimini: Aspetti diagnostici e consigli di profilassi e terapia. *Inf. tore agrario L* **10**: 65-67.

Becker, J., Vos, P., Kuiper, M., Salamini, F., Heun M. (1995) Combined mapping of AFLP and RFLP markers in barley. *Mol. Gen. Genet.*, **249**: 65-73.

Bignami, C. (2002) Attualità e problematiche della nocciolicoltura nel Lazio Atti del 2° Convegno Nazionale sul Nocciolo, Giffoni V. P., ottobre 2002.

Bleas, M. J., De Grandis S.A., Lee H., Trevors J.T (1998) Amplified fragment length polymorphism (AFLP): a review of the procedure and its applications. *J. Industrial Microbiol Biotech.* **21**:99-114.

Bottger, E. C. (1989) Rapid determination of bacterial ribosomal RNA sequences by direct sequencing of enzymatically amplified DNA. *FEMS Microbiol. Lett.* **65**:171-176.

Bradeen, J.M., Simon, P.W. (1998) Conversion of an AFLP fragment linked to the carrot Y2 locus to a simple, codominant, PCR-based marker form. *Theor. Appl. Genet.*, **97**:960-967.

Brenner, D. J., Fanning, G. R., Steigerwalt, A. G. (1977) Deoxyribonucleic acid relatedness among species of *Erwinia* and between *Erwinia* species and other enterobacteria. II Corn stalk rot bacterium and *Pectobacterium crysanthemii*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **27**:211-221.

Brugmans, B., van der Hulst, R. G. M., Visser, R. G. F., Lindhout, P., van Eck H. J. (2003) A new and versatile method for the successful conversion of AFLP markers into simple single locus markers, *Nucleic Acids Research*, **31**: 1-9.

Caetano-Anolles, G., B.J. Bassam, P.M. Gresshoff, (1991). DNA amplification fingerprinting using short arbitrary oligonucleotide primers. *Bio/Technology* **9**: 553-557.

Caetano-Anolles, G., Gresshoff P.M (1994) DNA amplification fingerprinting of plant gnomes. *Methods in Mol. Cell. Biol.* **5**:62-70.

Chen, K., Neimark H, Rumore P., Steinman C. R (1989) Broad-range DNA probes for detecting and amplifying eubacterial nucleic acids. *FEMS Microbiol. Lett.* **57**:19–24.

Clarridge, J. E. (2004) Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases, *Clinical Microbiology Reviews*, **17**: 840–862.

Clerc, A., C. Manceau, and X. Nesme. (1998). Comparison of randomly amplified polymorphic DNA with amplified length fragment polymorphism to assess genetic diversity and genetic relatedness within genospecies III of *Pseudomonas syringae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:1180-1187.

Cowan S. T., Liston, J., (1974) The mechanism of identification; in Buchanan R. E., Gibbons N. E.: *Bergey's Manual of determinative bacteriology*, 8a edizione, Williams e Wilkins, Baltimore, 10-13.

de Bruijn, F.J (1992) Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergenic consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 2180-2187

Dono, G., Franco, S., (2002) Politiche agricole e risultati economici delle aziende corilicole dei monti cimini, *Atti del 2° Convegno Nazionale sul Nocciolo*, Giffoni V. P., ottobre 2002.

Dye, D. W., (1968) A taxonomy study of the genus *Erwinia*. I. The *amylovora* group. N. Z. J. Sci. **11**:590-607.

Dye, D. W., (1969a) A taxonomy study of the genus *Erwinia*. II The *carotovora* group. N. Z. J. Sci. **12**: 81-97.

Dye, D. W. (1969b) A taxonomy study of the genus *Erwinia*. III. The *herbicola* group. N. Z. J. Sci **12**:223-236.

Fabi, A., Varvaro, L., (2004) Applicazione della tecnologia G.I.S./G.P.S. e della spettroscopia aerea (A.SP.I.S.) nello studio dell'epidemiologia della moria del nocciolo, Atti del convegno III Giornate di studio Metodi numerici, statistici e informatici nella difesa delle colture agrarie e delle foreste: ricerca e applicazioni 24-26 Nov. Firenze, 49-51.

Felsenstein, J. 1993. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.5c. Distributed by the author. Department of Genetics, University of Washington, Seattle.

Ferrari, M., Medici, D. (1996) Alberi e Arbusti in Italia. Ed. Edagricole, Bologna.

Garrity, G. M., Holt. J. G (2001) The road map to the manual, p.119–166. In G. M. Garrity (ed), Bergey's manual of systematic bacteriology. Springer-Verlag, New York, N.Y.

Gavini, F., Mergaert, J., Beji, A., Mielcarek, C., Izard, D., Kersters, K., De Lej, J., (1989) Transfer of *Enterobacter agglomerans* (Beijerinck 1888) Ewing and Fife 1972 to *Pantoea* gen nov. as *Pantoea agglomerans* comb. Nov. and description of *Pantoea dispersa* sp. Nov., Int. J. Syst. Bacteriol. **39**: 337-345.

Geornaras, I., Kunene, N.F., von Holy, A., Hastings, J.W. (1999) Amplified fragment length polymorphism fingerprinting of pseudomonas strains from a poultry processing plant. *Applied and Environmental Microbiology* **65**:3828-3833.

Goidanich, G., (1964) *Manuale di patologia vegetale*, Ediz. Agric. Bologna **2**:1283.

Granata, G., (1985) *L'informatore fitopatologico*, **4**.

Harmsen, D., Karch, H., (2004) 16S rDNA for diagnosing pathogens: a living tree. *ASM News* **70**:19-24.

Hauben, L., Moore, E.R.B., Vauterin, L., Steenackers, M., Mergaert, J., Verdonck, L., Swings, J., (1998). Phylogenetic position of phytopathogens within the *Enterobacteriaceae*, *System. Appl. Microbiol.*, **21**: 384-397.

Higgins, D.G., Sharp, P.M. (1988) Clustal: a package for performing multiple sequence alignment on a computer. *Gene* **73**:237-244.

Hill, M., Witsenboer, H., Zabeau, M., Vos, P., Kesseli, R., Michelmore, R., (1996) PCR-based fingerprinting using AFLPs as a tool for studying genetic relationships in *Lactuca* spp. *Theor. Appl. Genet.* **93**:1202-1210.

Huang, H., Liu, X., (1999) Pharmacognostical identification of *Artemisia argyi* and *Artemisia indica*, *Zhong Yao Cai.*; **22**(6):283-7.

Hugh, R., Leifson, E. (1953) The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram-negative bacteria, *J. Bacteriol.* **66**: 24-26.

Janse, J.D., Rossi, P., Angelucci, L., Scortichini, M., Derks, J.H.J., Akkermans, A.D.L., De Vrijer, R. Psallidas, P.G., (1996) Reclassification of *Pseudomonas syringae* pv. *avellanae* as *Pseudomonas avellanae* (spec. Nov.), the bacterium causing canker of hazelnut (*Corylus avellana* L.) System. Appl. Microbiol. **19**: 589-595.

Janssen, P., Coopman, R., Huys, G., Swings, J., Bleeker, H., Vos, P., Zabeau, M., Kersters, K. (1996). Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. Microbiology **142**: 1881–1893.

Jones, C., Edwards, K., Castaglione, S., Winfield, M., Sala, F., van de Wiel, C., Bredemeijer, G., Vosman, B., Matthes, M., Daly, A., Brettschneider, R., Bettini, P., Buiatti, M., Maestri, E., Malcevski, A., Marmioli, N., Aert, R., Volckaert, G., Rueda, J., Linacero, R., Vazquez, A., Karp, A. (1997) Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. Mol. Breed., **3**:381-390.

Karlin, S., Altschul, F. (1990). Methods for assessing the statistical significance of molecular sequence features by using general scoring schemes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **87**:2264-2268.

Karp, A., Seberg, O., Buiatti, M. (1996) Molecular techniques in the assessment of botanical diversity. Ann. Bot. **78**:143-149

Kovacs, N., (1956) Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction, Nature, London, **178**: 703.

Kwon, S. W., Go, S. J., Kang, H. W., Ryu, J. C., Jo, J. K. (1997) Phylogenetic analysis of *Erwinia* species based on 16S rRNA Gene sequences, Int. Journal of Systematic Bacteriology, **47**: 1061-1067.

Lechevalier M.P., (1982) Lipids in bacterial taxonomy. In: Handbook of microbiology. Laskin A.I. e Lechevalier M.P. (eds.), 2a ed., pp. 435-541. CRC Press, Inc., Boca Raton, FL.

Lieutaghi, P., (1974) Il libro degli alberi e degli arbusti. Natura Amica, Rizzoli Editore, Milano.

Liu, Z., Furnier G. R (1993) Comparison of allozyme, RFLP, and RAPD markers for revealing genetic variation within and between trembling aspen and bigtooth aspen. Theor. Appl. Genet. **87**: 97-105.

Liu, Z., Nichols, A., Li, P., Dunham, R. (1998) Inheritance and usefulness of AFLP markers in channel catfish (*Ictalurus punctatus*), blue catfish (*I. furcatus*) and their F1, F2 and backcross hybrids. Mol. Gen. Genet., **258**:260-268.

Loreti, S., Sarrocco, S., Galleli, A., (2001) Identification of hrp genes, encoding harpin protein, in *Pseudomonas avellanae* (Psallidas) Janse *et al.*, J. Phytopathology **149**:219-226 .

Loreti, S., Galleli, A., (2002) Rapid and specific detection of virulent *Pseudomonas avellanae* strains by PCR amplification, European Journal of Plant Pathology **108**:237-244.

Lu, J., Knox, M.R., Ambrose, M.J., Brown, .K.M.J, Ellis, T.H.N. (1996) Comparative analysis of genetic diversity in peas assessed by RFLP and PCR-based methods. Theor. Appl. Genet. **93**:1103-1111.

Majer, D., Mithen, R., Lewis, B., Vos, P., Oliver, R. (1996) The use of AFLP fingerprinting for the detection of genetic variation in fungi. Mycol. Res., **100**: 1107-1111.

Mantel, N. A. (1967). The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res.* **27**:209–220.

Mazzucchi, U. (1981) Elementi di batteriologia fitopatologica, volume I. Pitagora (ed.). Vol I°. Bologna. pp. 176

Meksem, K., Ruben, E., Hyten, D., Triwitayakorn, K., Lightfoot, D.A. (2001) Conversion of AFLP bands into high-throughput DNA markers. *Mol. Genet. Genomics*, **265**:207-214.

Miller L.T., (1982) Single derivatization method for routine analysis of bacterial whole-cell fatty acid methyl esters, including hydroxy acids. *Journal clinical microbiology*, **16**: 584-586.

Miller, P. W., Bollen, WB, Simmons, J. E., Gross, HN, and Barss, HP, (1940) *Phytopathology*, **30**: 713-33.

Morinet, F., (1992) Polymerase chain reaction (PCR) in microbiology. Value and practical applications. *Presse Med.* **12**;21(29):1377-80.

Moss, C.V., Dees, S.B., Guerrant, G.O., (1980) Gas-liquid chromatography of bacterial fatty acids with a fused-silica capillary column. *Journal clinical microbiology.*, **12**:127-130.

Noviello, C., (1968) Osservazioni sulle malattie parassitarie del Nocciolo, con particolare riferimento alla Campania. *Ann. Fac. Sc. Agr. Univ. Napoli, Portici*, **3**: 31.

Paran, I., Michelmore, R.W. (1993) Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theor. Appl. Genet.*, **85**: 985-993.

Paul, S., Wachira, F.N., Powell, W., Waught, R. (1997) Diversity and genetic differentiation among populations of Indian and Kenyan tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) revealed by AFLP markers. Theor. Appl. Genet. **94**:255-263.

Pavlenko, FA, Gorbunov, AF, (1985) Harmful insects of Ukrainian nut stands. Lesovod. Argolesom, **70**: 48-51.

Pesante, A., (1971) Viroses et maladies. Patologia e terapia del nocciolo, Compt. Rend. Trois. Journ. Phyt. Phytoph. Circum Mediterranèennes (20-24 Sept.) : 378-389.

Pirnay, J.P., De Vos, D., Cochez, C., Bilocq, F., Pirson, J., Struelens, M., (2003) Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* colonization in a burn unit: persistence of a multidrug-resistant clone and a silver sulfadiazine-resistant clone. J Clin Microbiol **41**: 1192–1202.

Poussier, S., Trigalet-Demery, D., Vandewalle, P., Goffinet, B., Luisetti, J., Trigalet, A. (2000) Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* as assessed by PCR-RFLP of the *hrp* gene region, AFLP and 16S rRNA sequence analysis, and identification of an African subdivision Microbiology, **146**(7): 1679 - 1692.

Psallidas, P.G., Panagopoulos, C.G., (1979) A bacterial canker of *Corylus avellana* in Greece, Phytopath. Z. **94**: 103-111.

Psallidas, P. G. (1993) *Pseudomonas syringae* pv. *avellanae* pathovar nov., the bacterium causing canker disease on *Corylus avellana* . Plant Pathol. , **42**: 358 363.

Qamaruz-Zaman, F., Fay, M.F., Parker, J.S., Chase, M.W. (1997) The use of AFLP fingerprinting in conservation genetics: a case study of *Orchis simia* (*Orchidaceae*). Preliminary report. Royal Botanica Gardens, Kew.

Ransom, D., Zon, L. (1999) Mapping zebrafish mutations by AFLP. *Methods Cell Biol.*, **60**:195-211.

Relman, D. A. (1999) The search for unrecognized pathogens. *Science* **284**: 1308–1310.

Rico, A., Ortiz-Barredo, A., Ritter, E., Murillo J. (2004) Genetic characterization of *Erwinia amylovora* strains by amplified fragment length polymorphism *Journal of Applied Microbiology*, **96**: 302–310.

Rohlf, F.J. (1994). NTSYS-pc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system, Ver. 1.80. Exeter Software, Setauket, NY.

Sacchi, C. T., Whitney, A. M., Mayer, L. W., Morey, R., Steigerwalt, A. Boras, A., Weyant, R. S., Popovic, T. (2002a) Sequencing of 16S rRNA gene: a rapid tool for identification of *Bacillus anthracis*. *Emerg. Infect. Dis.* **8**:1117–1123.

Sacchi, C. T., Whitney, A. M., Reeves, M. W., Mayer, L. W., Popovic, T. (2002b) Sequence diversity of *Neisseria meningitidis* 16S rRNA genes and use of 16S rRNA gene sequencing as a molecular subtyping tool. *J. Clin. Microbiol.* **40**:4520–4527.

Saitou, N., M. Nei (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**:406–425.

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.

Sharma, S.K., Knox, M.R., Ellis, T.H.N. (1996) AFLP analysis of the diversity and phylogeny of *Lens* and its comparison with RAPD analysis. *Theor. Appl. Genet.* **93**:751-758.

Schaad, N.W., (1988). Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. Moscow, ID, USA. 164 pp

Schroth, M. N., Hildebrand, D. C., (1980) *Erwinia. E. amylovora* or “true *erwiniae*” group. In: Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria (Schaad N. W., ed.) pp. 26-30. American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota.

Scortichini, M., (1996) La moria del nocciolo in Italia, L’informatore agrario **47**: 71-74.

Scortichini, M., Angelucci, L., (1999) Phenotypic characterization of *Pseudomonas avellanae* (Psallidas) Janse et al. and occurrence of colony variants, Journal of plant pathology **81**: 55-61.

Scortichini, M., Dettori, M.T., Marchesi, U., Palombi, M.A., Rossi, M.P., (1998) Differentiation of *Pseudomonas avellanae* strains from Greece and Italy by rep-PCR genomic fingerprinting, J. Phytopathology **146**:417-420.

Scortichini, M., Marchesi, U., Dettori, M.T., Angelucci, L., Rossi, M.P., Morone, C., (2000) Genetic and pathogenic diversity of *Pseudomonas avellanae* strains isolated from *Corylus avellanae* trees in north-west of Italy, and comparison with strains from other regions, European Journal of Plant Pathology, **106**:147-154.

Scortichini M., Sbaraglia M., Di Prospero P., Angelucci L., Petricca P., Tromboni R., Mazzuca T., Lucci E., Moretti D., Cirica B., Trucca L. (2001) Moria del nocciolo nel Viterbese e terreni acidi. 38): 65-67. L’Informatore Agrario LVII(**21**): 358-363.

Scortichini, M., Marchesi, U., (2001) Sensitive and specific detection of *Pseudomonas avellanae* using primers based on 16S rRNA gene sequence, J. Phytopathology **149**: 527-532.

Scortichini, M., (2002) Recenti acquisizioni sulle malattie batteriche del nocciolo in Italia, Atti del 2° Convegno Nazionale sul Nocciolo, Giffoni V. P., 62-66.

Speijer, H, Savelkoul, PH, Bonten, MJ, Stobberingh, EE, Tjhe HT (1999). Application of different genotyping methods for *Pseudomonas aeruginosa* in a setting of endemicity in an intensive care unit. *Journal of Clinical Microbiology*, **37**: 3654-3661.

Stead, D. E., (1991) Classification of *Pseudomonas syringae* pathovars by fatty acid profiling, Proc. 4th Int. working group on *Pseudomonas syringae* pathovars, Firenze Italia. ISPP and University of Florence, Florence, 381-390.

Stead, D. E., Hennessy, J., Elphistone, J. G. Wilson, J. K. (1997) Modern methods for classification of plant pathogenic bacteria including *Pseudomonas syringae*, p. 427-434. In K. Rudolph, T. J. Burr, J. W. Mansfield, D. Stead, A. Vivian, and J. von Kietzell (ed.), *Pseudomonas syringae* pathovars and related pathogens. Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands

Tautz, D, (1989) Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res.* **17**: 6463-6471.

Thein, S. L., Wallace R. B. (1986) The use of synthetic oligonucleotides as specific hybridization probes in the diagnosis of genetic disorders. In: Davies K. E. (Ed.) *Human Genetic Diseases - A Practical Approach*. Oxford, UK, IRL Press. 33-50.

Tombesi, A. (1985) *Il nocciolo*. Reda.

Travis, S.E., Maschinski, J., Keim, P. (1996) An analysis of genetic variation in *Astragalus cremnophylax* var. *cremnophylax*, a critically endangered plant, using AFLP markers. *Mol. Ecol.* **5**:735-745.

Varvaro, L., (1992) A dieback of hazelnut (*Corylus avellana* L.) in the north of Latium: etiology and control. III Int. Congr. On Hazelnut, Alba (CN) 14-18 Sept. 1992.

Varvaro, L., (1993) Le fitopatie del nocciolo nell'alto Lazio: un triennio di osservazioni e di strategie di lotta, *Informatore fitopatologico* **2**:54-58.

Varvaro, L., Costa, A., Balestra, G.M., (1990) A new bacterial disease of *Corylus avellanae*, VIII Congr. Of Mediterranean Phytopathological Union, Agadir Marocco, 469-471

Vauterin, L., Hoste, B., Kersters, K., Swings, J. (1995). The relationship within genus *Xanthomonas* and a proposal for a new classification. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **45**: 472-489.

Versalovic, J., Koeuth, T., Lupski, J.R. (1991) Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucl. Acids Res.* **19**: 6823-6831.

Versalovic, J., Schneider, M., de Bruijn, F.J., Lupski, J.R. (1994) Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence based PCR (rep-PCR). *Meth.Cell. Mol. Biol.* **5**: 25-40.

Viggiani, G., (1979) Tendono ad allargarsi gli attacchi di *Anisandrus dispar* al nocciolo, *Inf. Agrar.* **35**: 5335-37.

Viggiani, G., (1982) Natural enemies of the filbert aphids in Italy, *Eur. Community Experts Meet.*, Portici 22-24 Nov., 109-113.

Viggiani, G., (1984a) Avversità malattie e fitofagi del nocciolo. Regione campania. *Serv. Agric. Caccia Pesca Sez. Promoz. Svilupp. Ser. Man.*, **7**: 1-152.

Viggiani, G., (1984b) Recent advances on hazelnut fitofagous pests control. Proc. Int. Congr. Hazelnuts, Avellino, Italia, Sett. 1983, 193-198.

Viggiani, G., (1985) Fenologia, nemici naturali e controllo di *Quadraspidiotus ostraeformis* Curtis (Homoptera: Diaspididae) su nocciolo. Boll. Lab. Entomol. Agrar. Filippo Silvestri, **42**: 3-9.

Viggiani, G., (1994) Current management of hazelnut disease and pests. Acta Hort. **351**: 531-541.

Viggiani, G., Ragazzino, A., Grande, C., (1979) La difesa fitosanitaria del nocciolo, Regione Lazio Assessorato agricoltura e foreste 7-23.

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Fritjers, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M. (1995) AFLP: a new concept for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res., **23**: 4407–4414.

Waterman, M. S. (1995) Introduction to computational biology, p. 201–202. Chapman & Hall, New York, N.Y.

Welsh J, McClelland, M (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Res. **18**:7213-7218.

Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey S.V. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. **18**:6531-6535.

Winslow, C. E. A., Broadhurst, J., Buchanan, R. E., Krumwiede, C., Rogers, L. A., Smith, G. H. (1917) The families and genera of the bacteria. Preliminary report of the Committee of the Society of American Bacteriologists on Characterization and Classification of Bacterial Types. J. Bacteriol. **2**:505-566.

Witt, R., (1987) *Cespugli e Arbusti selvatici*. Franco Muzzio Editore, Padova.

Woese, C. R. (1987) Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* **51**:221–271.

Woese, C. R., E. Stackebrandt, T. J. Macke, G. E. Fox. (1985) A phylogenetic definition of the major eubacterial taxa. *Syst. Appl. Microbiol.* **6**:143–151.

Yan, G., Romero, S., Walton, M., Chadee, D., Severson, D. (1999) Population genetics of the yellow fever mosquito in Trinidad: comparisons of amplified fragment length polymorphism (AFLP) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) markers. *Mol. Ecol.*, **8**:951-963.

Zabeau, M., P. Vos. 1993. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. European Patent Publication 92402629 (Publication no. EP0534858A1).