

## **Metodi molecolari nella diagnosi fitobatteriológica**

CHIARALUCE MORETTI, ROBERTO BUONAURO

Dipartimento di Arboricoltura e Protezione delle Piante,  
Università degli Studi di Perugia-Borgo XX Giugno 74, I-06121 Perugia

### **Riassunto**

Le tecniche tradizionali attualmente utilizzate nella diagnosi delle malattie batteriche delle piante - che si basano essenzialmente su saggi morfologici, biochimici, nutrizionali e di patogenicità - nonostante siano molto accurate richiedono tempi di esecuzione assai lunghi e, avendo in genere bassa sensibilità, non sono applicabili su un numero elevato di campioni. Con l'avvento della biologia molecolare e, in particolare della reazione a catena della polimerasi (PCR), tali tecniche vengono progressivamente affiancate e sostituite da quelle molecolari, che, al contrario, sono in genere rapide, specifiche e sensibili. Molti protocolli diagnostici molecolari, attualmente adoperati in fitobatteriológica, prevedono l'amplificazione mediante PCR, talvolta seguita dalla digestione degli ampliconi con enzimi di restrizione, di geni cromosomiali o plasmidici della patogenicità e/o della virulenza del batterio target, di sequenze geniche dell'operone rDNA, come 16S e 23S rRNA, regioni spaziatrici trascritte e tRNA. L'identificazione e la caratterizzazione dei batteri fitopatogeni si avvale delle tecniche di *fingerprinting* accoppiate ad opportune analisi statistiche, come *randomly amplified polymorphic DNA* (RAPD), *repetitive sequence-based-PCR* (rep-PCR) e *amplified fragment length polymorphism* (AFLP). Recentemente sono stati sviluppati metodi molecolari che stanno aprendo nuovi orizzonti nella diagnosi delle malattie batteriche delle piante, in particolare *immunocapture-PCR*, *nested-PCR*, *real-time PCR* e la tecnologia *DNA microarray*, tra l'altro, incrementano notevolmente la sensibilità e la riproducibilità dei protocolli. Le informazioni sul sequenziamento dell'intero genoma dei batteri fitopatogeni, attualmente limitate ad alcune specie, quando saranno complete, daranno un consistente impulso al settore della diagnosi fitobatteriológica, per la presumibile individuazione di sequenze specifiche per ciascun batterio fitopatogeno.

(Ricevuto il 16 febbraio. 2003)

**Parole chiave:** Batteri fitopatogeni, Diagnosi, DNA, *Fingerprinting*, PCR, Tecniche molecolari.

### **Summary**

#### **Molecular methods in phytobacteriological diagnosis.**

Traditional techniques used in the diagnosis of plant bacterial diseases are essentially based on morphological, biochemical, nutritional and pathogenicity tests. Although very accurate, they are time-consuming, with a general low sensitivity and not applicable on a large number of samples. With the advent of molecular biology and, in particular, the polymerase chain reaction (PCR) the traditional techniques are progressively supported and replaced by molecular techniques, which, on the contrary,

are rapid, specific and sensitive. Many phytobacteriological diagnostic protocols are based on the PCR amplification, sometimes followed by the amplicon digestion with restriction enzymes, of chromosomal and plasmidic pathogenicity and/or virulence bacterial genes, rDNA operon sequences, such as 16S and 23S rRNAs, intergenic transcribed spacer and tRNAs. Identification and characterization of plant pathogenic bacteria is also based on fingerprinting protocols, such as randomly amplified polymorphic DNA (RAPD), repetitive sequence-based-PCR (rep-PCR) and amplified fragment length polymorphism (AFLP), associated with appropriate statistical analyses. The recently developed molecular analyses such as immunocapture-, nested- and real-time-PCR as well as DNA microarray technology are opening up new horizons in phytobacteriological diagnosis. They are especially increasing the sensitivity and reproducibility of the diagnostic protocols. When information on genome sequences of plant pathogenic bacteria, so far limited to some species, will be completed, a substantial boost will be given to the diagnosis in phytobacteriology due to the individuation of specific sequences for each bacterium.

(Received February, 16, 2003)

**Key words:** Phytopathogenic bacteria, Diagnosis, DNA, Fingerprinting, PCR, Molecular techniques.