

**DIAGNOSI E MONITORAGGIO DI
PSEUDOMONAS AVELLANAE AGENTE
DELLA 'MORIA' DEL NOCCIOLO NEL VITERBESE**

Adriana Bosco, Angela Gallelli, Stefania Loreti

C.R.A. - Istituto Sperimentale per la Patologia Vegetale
Via C.G. Bertero, 22, I-00156 Roma
e-mail: s.loreti@ispave.it

Riassunto

Il batterio *Pseudomonas avellanae*, agente causale del cancro batterico del nocciolo, meglio noto come 'moria', è un patogeno caratterizzato da un'elevata aggressività nei confronti della specie ospite che può portare a morte nell'arco di sei mesi. È un patogeno sistemico, quindi presente anche nel materiale di propagazione, aspetto preoccupante in quanto i polloni sono frequentemente utilizzati per la costituzione di nuovi impianti. Non esiste, inoltre, alcun tipo di intervento chimico risolutivo, di conseguenza il controllo della diffusione di questa malattia si fonda principalmente sulla prevenzione. L'efficacia degli interventi di prevenzione è basata sulla disponibilità di tecni-

che diagnostiche valide, utilizzabili da più strutture operanti dello specifico settore (laboratori di diagnosi accreditati e Servizi Fitosanitari Regionali). La diagnosi mediante la reazione a catena della polimerasi (PCR) basata sull'uso di inneschi specifici scelti sulle sequenze del gene *hrpW*, permette il rilevamento rapido, specifico e sensibile di *P. avellanae*. Vengono di seguito descritti i protocolli messi a punto per la diagnosi del batterio da materiale sintomatico e asintomatico e la loro applicazione ai fini del monitoraggio della malattia.

Parole chiave: Cancro batterico, Diagnosi, Isolamento, PCR, Geni *hrp*.

Summary

Survey and diagnosis of *Pseudomonas avellanae*, causal agent of hazelnut bacterial decline in the Viterbo province (central Italy)

Pseudomonas avellanae the main cause of bacterial canker and decline of hazelnut, the so called ‘moria’ in central Italy, is very aggressive towards the host plant that can kill within a period of few months. The pathogen can systemically migrate in the woody tissues and so can be present on the propagative material. The sanitary assessment of the suckers, used for the establishing new hazelnut orchards, is usually not carried out. Moreover, the chemical control of the disease is not resolute. The application of a diagnostic method, able to ascertain the presence of the pathogen inside the plants, is very important to enhance the sanitation of the affected areas, since the destruction of wilted branches and the

uprooting of diseased hazelnut trees are regarded as fundamental to avoiding the spread of the pathogen. The use of a diagnostic technique, based on specific primers deduced on *hrpW* sequence to use in polymerase chain reaction (PCR), represents a useful tool for the rapid screening of propagative material and for the control of the efficacy of sanitation of an area. This paper reports on the diagnosis of *P. avellanae* from symptomatic and asymptomatic plant materials and the application to monitoring the disease.

Key words: Hazelnut decline, Diagnosis, Isolation, PCR, *hrp* genes.

Introduzione

A partire dalla fine degli anni ‘70, nella zona dei Colli Cimini in provincia di Viterbo, il fenomeno noto come ‘moria’ del nocciolo ha causato gravi danni a dispetto di tutte le misure profilattiche adottate. L’agente causale è il batterio *Pseudomonas avellanae*, caratterizzato da un elevato grado di aggressività nei confronti della specie ospite (Scortichini e Tropiano, 1994; Janse *et al.*, 1996). Al fine di contenere la disseminazione del patogeno, oltre alla distruzione dei focolai d’infezione, è necessario disporre di strumenti di monitoraggio della malattia e di controllo del materiale di propagazione, essendo il patogeno sistemico.

L’efficacia di tutti questi tipi di interventi è basata sostanzialmente sulla disponibilità di strumenti diagnostici validi. La diagnosi tradizionale di *P. avellanae* mediante l’isolamento del patogeno dal tessuto vegetale infetto, la messa in coltura pura dello stesso e l’applicazione di saggi biochimico-fisiologici e nutrizionali per l’identificazione della specie, comporta un notevole dispendio di tempo. Per contro, la diagnosi molecolare, come la reazione a catena della polimerasi (PCR), garantisce oltre alla rapidità di esecuzione, la possibilità di appli-

cazione ad un elevato numero di campioni, mantenendo una elevata sensibilità ed affidabilità del metodo. Attualmente, si dispone di due metodi per la diagnosi mediante PCR di *P. avellanae* (Scortichini e Marchesi, 2001; Loreti e Gallelli, 2002).

Attraverso l'applicazione del metodo di PCR messo a punto da Loreti e Gallelli (2002), sono stati definiti dei protocolli per la diagnosi del batterio, oltretutto da materiale sintomatico, anche da polloni apparentemente asintomatici. Tali protocolli sono stati utilizzati per il monitoraggio del batterio in tre diverse aree in cui la malattia è ormai conclamata, per una valutazione del rischio di diffusione del batterio. Si riportano i risultati relativi all'attività svolta durante il periodo 2003-2005.

La malattia e l'agente causale

La 'moria' del nocciolo si manifesta con scoppi epidemici ai quali possono alternarsi periodi nei quali rimane endemica. Nella primavera del 1998 e del 1999 si è assistito ad una recrudescenza della malattia, in particolare nei comuni di Capranica, Sutri, Ronciglione, Caprarola e Soriano, dove sono stati estirpati circa 400 ettari di nocciolo, tanto da destare l'interesse dell'opinione pubblica (Il Messaggero 26-09-1999) e l'emanazione di un progetto di legge al fine di cautelare gli interessi economici dei produttori. La malattia si manifesta in primavera con avvizzimento di foglie e dei rami con conseguente pallida colorazione della vegetazione. Seguirà, durante il periodo estivo, il disseccamento di rami e branche e talvolta dell'intera pianta; il disseccamento è talmente repentino che le foglie rimangono saldamente attaccate ai rami. Le branche e i rami possono presentare aree brune, idropiche, alle quali corrispondono, in prossimità del cambio, necrosi e annerimenti dei tessuti. In corrispondenza dei cancri, può osservarsi emissione di essudati batterici e linfa. In autunno, i frutti dei rami malati rimangono saldamente attaccati all'asse vegetativo disseccato. L'apparato radicale presenta estese necrosi che possono estendersi alla ceppaia e da qui alle branche. Durante il periodo invernale è possibile osservare avvizzimento e imbrunimento di gemme femminili e a legno, e avvizzimento degli amenti che rimangono inseriti ai rami; come conseguenza la fioritura è scarsa (Scortichini, 1992).

Il batterio *P. avellanae* (Psallidas) Janse *et al.*, 1996, è considerato l'agente causale della malattia (Scortichini e Tropiano, 1994; Janse *et al.*, 1996). Individuato a partire dagli anni 1980 in Grecia (Psallidas e Panagoulopous, 1979; Psallidas, 1987; Psallidas, 1993), in Italia è stato segnalato nei primi anni '90 in provincia di Roma e Viterbo (Scortichini, 1992). Il batterio penetra nella pianta attraverso le cicatrici fogliari in autunno e migra sistemicamente fino a raggiungere l'apparato radicale (Scortichini e Lazzari, 1996). Può causare la morte della pianta nell'arco di sei mesi fino a qualche anno. Studi volti all'identificazione di resistenze naturali nel germoplasma di *Corylus avellana* L. hanno evidenziato l'elevata suscettibilità di questa specie al batterio (Scortichini, 1998).

In questo contesto, appare fondamentale il controllo della diffusione della malattia, per il quale, parallelamente alla distruzione dei focolai d’infezione è necessario disporre di strumenti di monitoraggio della malattia e di controllo del materiale di propagazione, essendo il patogeno sistemico.

Caratteristiche peculiari di un efficace metodo di diagnosi

Un protocollo di diagnosi efficace ed operativo deve prevedere il perseguimento dei seguenti obiettivi:

- semplicità e rapidità di esecuzione, basso impatto economico, applicabilità su larga scala, al fine di consentire l’analisi di un elevato numero di campioni nel corso di indagini massali;
- affidabilità, specificità e sensibilità, al fine di annullare il rischio di falsi positivi e/o falsi negativi, per garantire l’assenza nel materiale di propagazione e l’accertamento di campioni sospetti;
- atossicità, a garanzia della salubrità dell’operatore.

Diagnosi tradizionale di *Pseudomonas avellanae*

La diagnosi tradizionale di *P. avellanae* è molto dispendiosa in termini di tempo per l’ottenimento del risultato, inoltre non permette l’identificazione di infezioni latenti. È basata sull’isolamento diretto, l’ottenimento di una coltura pura e l’applicazione di saggi biochimici, fisiologici e nutrizionali.

L’isolamento diretto si effettua macerando, in soluzione fisiologica sterile, piccoli frammenti (circa 1 cm) di tessuto legnoso, prelevato a confine tra area sana e area necrotica. Una aliquota della sospensione, opportunamente lasciata a decantare, viene piastrata su terreno nutritivo aggiunto di saccarosio al 5% (NSA). Su questo terreno *P. avellanae* (così come altre pseudomonadi, nonché *Erwinia amylovora*), forma delle colonie aventi una caratteristica conformazione a cupola (levaniformi). L’incubazione a temperature di 26-28 °C per 48 ore determina la crescita, oltrechè delle colonie dell’agente causale, anche di batteri saprofiti od opportunisti associati al nocciolo. Le colonie levaniformi sono quindi piastrate fino ad ottenere una coltura pura. Su quest’ultima vengono applicati i saggi necessari per l’identificazione della specie (ipersensibilità su tabacco, presenza di ossidasi, presenza di catalasi, metabolismo del glucosio, capacità di utilizzo di L(+)-tartrato, L-arginina, L-asparagina). Il risultato della diagnosi si ottiene in almeno 6-8 giorni. Qualora si dovesse effettuare la prova di patogenicità sull’ospite i tempi si allungano fino a 6-7 mesi.

Diagnosi basata sul polimorfismo delle proteine solubili totali e del DNA genomico

L'analisi del polimorfismo delle proteine solubili totali e l'analisi del polimorfismo del DNA genomico mediante uso di sequenze aspecifiche (es. RAPD) o sequenze ripetute (es. minisatelliti, rep-PCR) permettono l'ottenimento di un risultato in circa 5-6 giorni. Infatti, entrambe necessitano della coltura pura del patogeno ed essendo basate sul confronto di un complesso profilo di bande con quello del ceppo di riferimento, sono di piuttosto difficile interpretazione. Non consentono, inoltre, l'identificazione del patogeno in caso di infezioni latenti.

Diagnosi mediante PCR specifica

L'acquisizione di conoscenze sul DNA genomico dei batteri e in particolare di *P. avellanae*, ha permesso la scelta di inneschi specifici che consentono l'amplificazione di brevi tratti del DNA del batterio. La PCR è basata sull'ottenimento di bande specifiche che vengono visualizzate mediante corsa su gel di agarosio. Quando effettuata su una sospensione della colonia batterica, la PCR permette l'ottenimento del risultato in circa 4-5 giorni, mentre qualora applicata direttamente su DNA estratto da matrice vegetale fornisce il risultato in 1-2 giorni. In quest'ultimo caso la diagnosi è, quindi, molto rapida. Inoltre, il risultato è di facile interpretazione essendo basato sulla presenza/assenza di una specifica banda cui corrisponde presenza/assenza di infezione batterica.

Attualmente sono disponibili due metodi di diagnosi mediante PCR (Scortichini e Marchesi, 2001; Loreti e Gallelli, 2002). Il primo metodo è basato sulla amplificazione di un tratto di 762 pb del gene codificante il 16S rRNA. Quest'ultimo è un gene conservato, il cui sequenziamento è frequentemente utilizzato come tecnica di identificazione di specie batteriche (Minardi e Mazzucchi, 1999). Questa metodica ha permesso di confermare la stretta correlazione esistente tra *P. avellanae*, *P. syringae* pv. *theae* e *P. syringae* pv. *actinidiae*, permettendo l'ottenimento dell'amplicone di 762 pb su tali microrganismi (Scortichini *et al.*, 2002). La seconda metodica fa uso di inneschi specifici (WA e WC) scelti sulla sequenza del gene *hrpW* caratterizzato in *P. avellanae* (Loreti *et al.*, 2001). I geni *hrp*, organizzati in un "cluster", controllano la capacità dei batteri fitopatogeni a indurre la patogenicità nell'ospite e la risposta ipersensibile in piante resistenti (He *et al.*, 1993; Lindgren, 1997). In particolare, il gene *hrpW* codifica per una arpina, proteina caratteristica dei batteri fitopatogeni, la cui funzione è conservata nei fitobatteri, ma la rispettiva sequenza nucleotidica differisce fra diverse specie. L'amplicone è lungo 350 pb. La PCR è stata messa a punto, con esito positivo, a partire da DNA genomico del batterio, dalla colonia batterica, e infine, direttamente da DNA estratto da tessuto legnoso di nocciolo infetto. Al fine di verificare la specificità di reazione sono stati utilizzati in PCR, come controllo, varie altre specie di batteri fitopatogeni

(*Agrobacterium*, *Erwinia*, *Xanthomonas*, *Ralstonia*), altre pseudomonadi (*Pseudomonas viridiflava*, *putida*, *cichorii*, *corrugata*, *syringae*, *savastanoi*, *marginalis*), varie pathovars di *P. syringae* (*syringae*, *tomato*, *morsprunorum*, *actinidiae*, *lachrymans*), e vari batteri opportunisti e/o saprofiti associati al nocciolo. Soltanto i ceppi di *P. avellanae* hanno dato reazioni positive in PCR, confermando la specificità del metodo e la sua possibilità di applicazione sia sulla colonia batterica che direttamente su DNA estratto da tessuto vegetale naturalmente infetto (Fig. 1a). Relativamente la sensibilità del metodo è possibile individuare fino a 20 pg di DNA e 2×10^3 CFU/reazione PCR anche in presenza di un eccesso di 1:20 e 1:200 di cellule di *P. syringae* pv. *syringae* (Loreti e Gallelli, 2002).

È stata, inoltre, verificata la possibilità di conservare i campioni prelevati in campo al fine di analizzarli in tempi più lunghi. Mantenendoli a 4 °C per circa un mese, non veniva inficiato il risultato della diagnosi mediante PCR, consentendo l'analisi di un elevato numero di campioni (diagnosi massale) (Fig. 1b).

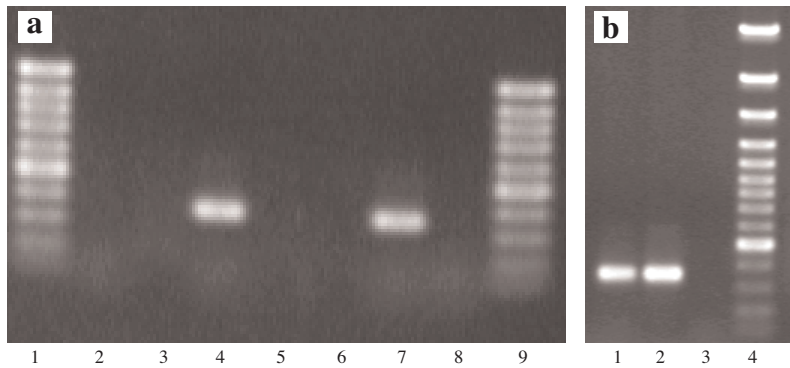


Fig. 1 – a) Analisi elettroforetica dei prodotti di amplificazione ottenuti con gli inneschi WA e WC da DNA estratto da materiale vegetale sintomatico (banda di 350 pb). 1, 9 = marcatore di peso molecolare (GeneRulerTM 100 bp DNA Ladder, Fermentas); 4, 7 = DNA estratto da campioni di nocciolo infetti da *Pseudomonas avellanae*; 3, 5, 6 = DNA estratto da campioni di nocciolo non infetti; 2, 8 = controllo negativo (acqua); b) analisi elettroforetica dei prodotti di amplificazione ottenuti con gli inneschi WA e WC da DNA purificato da colonia di *Pseudomonas avellanae* (2) e da DNA estratto da polloni asintomatici (1) precedentemente conservati per 30 giorni a 4°C; 3 = controllo acqua, 4 = marcatore di peso molecolare (GeneRulerTM 100 bp DNA Ladder Plus, Fermentas).

Monitoraggio della malattia

***Pseudomonas avellanae*.** Durante il periodo 2003-2005, è stato effettuato un monitoraggio in tre impianti del Viterbese, nelle aree dove la malattia è conclamata (Vico Matrino, lago di Vico). Al fine di valutare il rischio di diffusione e la presenza del patogeno sono stati campionati polloni asintomatici e campioni sintomatici (rami, branche o parte di tronco). Su tutti i campioni è stato effettuato l'isolamento diretto su NSA e, sulle colonie sospette (levaniformi), è stata applicata la PCR specifica per verificare l'appartenenza a *P. avellanae*.

Isolamento da polloni asintomatici. Da ciascun campione, costituito da 5-6 polloni di una singola pianta (sintomatica o non), sono stati prelevati piccoli frammenti (circa 1 cm) di tessuto legnoso su tutta la lunghezza del pollone secondo un andamento ad elica. Il materiale è stato macerato in circa 100 μ l di soluzione fisiologica. Le cellule batteriche rilasciate nel supernatante sono state concentrate attraverso centrifugazione (10 min, 10.000 rpm) e risospensione del pellet in 1 ml di soluzione fisiologica sterile, una aliquota della quale è stata piastrata su NSA. Da ciascun areale sono stati prelevati 5-10 campioni.

Isolamento da campioni sintomatici (ramo, branca o parte di tronco). È stato effettuato il prelievo di piccoli frammenti di tessuto legnoso a confine fra area necrotica e area sana su campioni con cancri evidenti. Dopo macerazione è stata piastrata una aliquota del supernatante su NSA.

Per i campioni privi di cancro, ma prelevati in posizione adiacente a rami o branche avvizzite su piante aventi sintomi di avvizzimento generale, il prelievo e l'isolamento è stato effettuato secondo la modalità descritta per i polloni. I risultati del monitoraggio sono riportati in Tab. 1 (2003-2004) e Tab. 2 (2005).

TABELLA 1 – Risultati del monitoraggio effettuato su materiale sintomatico (ramo, branca o parte di tronco) e su polloni asintomatici nell'anno 2003-2004. Sono riportati i campioni risultati positivi alla diagnosi per *Pseudomonas avellanae* sul totale di campioni prelevati. Nell'ultima riga è indicato il totale per tutto il periodo 2003-2004 e il relativo valore percentuale fra le parentesi.

2003-2004	Pollone	Campione sintomatico
Novembre	1/28	2/7
Marzo	1/19	0/8
Luglio	0/25	—
Totale	2/47 (3%)	2/15 (13%)

TABELLA 2 – Risultati del monitoraggio effettuato su campioni sintomatici (ramo, branca o parte di tronco) e su polloni asintomatici nell'anno 2005. Sono riportati i campioni risultati positivi alla diagnosi per *Pseudomonas avellanae* sul totale di campioni prelevati. Per i campioni sintomatici è riportato: il totale parziale e il rispettivo valore percentuale (2%) al giugno 2005, il valore percentuale del risultato del campionamento di settembre 2005 (19%), il totale relativo a tutto il periodo del 2005 e il relativo valore percentuale tra parentesi (ultima riga).

2005	Pollone	Campione sintomatico
I Febbraio	0/13	0/9
II Febbraio	0/13	0/14
Marzo	0/2	0/7
Aprile	0/1	0/3
Maggio	2/10	1/5
Giugno	0/30	0/12
Totale parziale	—	1/50 (2%)
Settembre	—	7/37 (19%)
Totale	2/69 (3%)	8/87 (9%)

Il campionamento di polloni asintomatici ha evidenziato la presenza del batterio nel 3% dei campioni saggiati (Tab. 1 e 2). Nel 2003-2004 (Tab. 1), il batterio è stato rinvenuto nel 13% dei campioni sintomatici, mentre nel 2005, fino al mese di giugno, è stata osservata una incidenza del solo 2% di campioni positivi per *P. avellanae* (Tab. 2). Pertanto, nel settembre 2005, sui campioni sintomatici raccolti è stato effettuato, in parallelo, sia l'isolamento diretto che la PCR. Su 37 campioni sintomatici, 7 sono risultati positivi in PCR, ma negativi in isolamento diretto (assenza di colonie levaniformi). Quindi, applicando la diagnosi molecolare direttamente su materiale vegetale sintomatico è stato ottenuto un aumento della rilevabilità del batterio dal 2 al 19%. Inoltre, per escludere che la diagnosi molecolare avesse dato false positività, è stata eseguita la PCR su tutte le colonie morfologicamente diverse da *P. avellanae* rilevate in fase di isolamento. La PCR ha dato esito negativo, confermando così il risultato della diagnosi molecolare. Sulla base di questo dato, si ritiene necessario il supporto della diagnosi molecolare a quella tradizionale, poiché non sempre è possibile isolare il batterio.

Altre specie batteriche. Durante l'isolamento è stata frequentemente rilevata la presenza di colonie levaniformi che, tuttavia, risultavano negative alla diagnosi molecolare per *P. avellanae*. Tali colonie sono state infatti identificate come *P. syringae* pv. *syringae*, un batterio la cui presenza associata al nocciolo è già stata segnalata (Loreti *et al.*, 1999, Scortichini *et al.*, 2000) e che, frequentemente, è presente come epifita in varie specie vegetali (Scortichini, 1995). L'utilizzo della PCR applicata alla colonia batterica appare di enorme utilità quando, come in questo caso, si debbano distinguere colonie aventi morfologia simile come *P. avellanae* e *P. syringae* pv. *syringae*.

Fase vegetativa dell'ospite. Il campionamento è stato effettuato in diverse fasi vegetative delle piante ospiti. Durante il primo anno è stato possibile isolare il batterio durante i mesi invernali (novembre, marzo), mentre nel 2005 durante i mesi più miti (maggio, settembre), confermando la possibilità di isolare *P. avellanae* durante vari periodi dell'anno.

Conclusioni

La disponibilità di un accurato metodo per la diagnosi di *Pseudomonas avellanae* è fondamentale ai fini del contenimento della diffusione della malattia, visto che tutte le misure di controllo sono di tipo preventivo. La diagnosi molecolare (PCR), mediante uso di inneschi specifici, risponde alle caratteristiche necessarie per la definizione di un efficace metodo diagnostico. In particolare, il metodo di amplificazione genica messo a punto utilizzando inneschi complementari al gene *hrpW* (Loreti e Gallelli, 2002) si è rivelato efficace per la diagnosi del patogeno: – è affidabile e specifico: permette l'amplificazione di un tratto di 350 pb del gene *hrpW* di *P. avellanae* e non di altri batteri fitopatogeni o saprofiti o opportunisti;

- è di semplice e rapida esecuzione: consente l'ottenimento di risultati al massimo in due giorni;
- non fa uso di sostanze tossiche;
- è applicabile su larga scala: mantenendo i campioni a 4 °C per un mese è possibile analizzare numerosi campioni;
- è sensibile;
- può essere applicato direttamente su DNA estratto da tessuto vegetale sia sintomatico che asintomatico.

La PCR è stata, infatti, applicata con successo per il rilevamento di infezioni latenti su polloni asintomatici (Fig. 1b). Inoltre, quando applicata per la diagnosi su ramo, branca o parti di tronco sintomatici, ha evidenziato la presenza di campioni positivi non individuati con l'isolamento diretto. Ciò sottolinea i limiti dell'isolamento diretto per il rilevamento del batterio anche da matrice sintomatica e la necessità di ricorrere, in parallelo, alla diagnosi molecolare. Inoltre la PCR, quando applicata sulle colonie a morfologia sospetta ottenute in fase di isolamento diretto, permette di discriminare precocemente *P. avellanae* da batteri aventi morfologia simile, come *P. syringae* pv. *syringae* la cui presenza è stata rinvenuta sui noccioli infetti e non (Loreti *et al.*, 1999; Scortichini *et al.*, 2000).

Relativamente al monitoraggio della malattia, è stata confermata la possibilità di isolare *P. avellanae* durante vari periodi dell'anno, anche durante il periodo invernale, quando i sintomi sono meno evidenti. Il monitoraggio ha rilevato una ridotta presenza del patogeno; se da un lato ciò può essere imputabile al limite dell'isolamento diretto, si ritiene che possa essere il risultato dell'applicazione di adeguati interventi preventivi, da parte degli operatori del settore, nelle zone colpite da 'moria'. Ciò conferma l'efficacia di adeguate operazioni colturali ai fini del contenimento della malattia. Inoltre, la possibilità di controllare il materiale di propagazione, aspetto ancora piuttosto trascurato dal vivaismo locale, potrebbe supportare la costituzione di nuovi impianti, migliorando ulteriormente lo stato sanitario delle aree colpite da 'moria'.

Ringraziamenti

Gli autori ringraziano il Dott. Marco Scortichini e il P.A. Massimo Galli per il contributo fornito in fase di monitoraggio della malattia.

Lavori citati

HE S.Y., H.C. HUANG, A. COLLMER, 1993. *Pseudomonas syringae* harpin_{PSS}: a protein that is secreted via the Hrp pathway and elicit the hypersensitive response in plants. *Cell*, **73**, 1255-1266.

- JANSE J.D., M.P. ROSSI, L. ANGELUCCI, M. SCORTICHINI, J.H.J. DERKS, A.D.L. AKKERMANS, R. DE VRIJER, P.G. PSALLIDAS, 1996. Reclassification of *Pseudomonas syringae* pv. *avellanae* as *Pseudomonas avellanae* (spec. nov.), the bacterium causing canker of hazelnut (*Corylus avellana* L.). *Systematic and Applied Microbiology*, **19**, 589-595.
- LINDGREN P.B., 1997. The role of *hrp* genes during plant-bacterial interactions. *Annual Review of Phytopathology*, **35**, 129-52.
- LORETI S., S. SARROCCO, A. GALLELLI, 1999. Preliminary investigation of *hrpZ* gene presence in *Pseudomonas avellanae* and in a bacterium inducing HR on tobacco. *Journal of Plant Pathology*, **81**, 234.
- LORETI S., S. SARROCCO, A. GALLELLI, 2001. Identification of *hrp* genes, encoding harpin, in *Pseudomonas avellanae* (Psallidas) Janse et al. *Journal of Phytopathology*, **149**, 219-226.
- LORETI S., A. GALLELLI, 2002. Rapid and specific detection of virulent *Pseudomonas avellanae* strains by PCR amplification. *European Journal of Plant Pathology*, **108**, 237-244.
- MINARDI P., U. MAZZUCCHI, 1999. La fitobatteriolgia verso il Duemila. *Petria*, **9** (1-2), 1-25.
- PSALLIDAS P.G., C.G. PANAGOPOULOS, 1979. A bacterial canker of filbert in Greece. *Phytopathologische Zeitschrift*, **94**, 103-111.
- PSALLIDAS P.G., 1987. The problem of bacterial canker of hazelnut in Greece caused by *Pseudomonas syringae* pv. *avellanae*. *EPPO Bulletin*, **17**, 257-261.
- PSALLIDAS P.G., 1993. *Pseudomonas syringae* pv. *avellanae* pathovar nov., the bacterium causing canker disease on *Corylus avellana*. *Plant Pathology*, **42**, 358-363.
- SCORTICHINI M., 1992. Moria del nocciolo: grave attacco di *Pseudomonas syringae* pv. *avellanae*. *L'Informatore Agrario*, **49**, 60-63.
- SCORTICHINI M., P.G. TROPANO, 1994. Severe outbreak of *Pseudomonas syringae* pv. *avellanae* on hazelnut in Italy. *Journal of Phytopathology*, **140**, 65-70.
- SCORTICHINI M., 1995. Malattie batteriche delle colture agrarie e delle specie forestali. Edagricole - Edizione Agricole della Calderini s.r.l. - Bologna, 436 pp.
- SCORTICHINI M., M. LAZZARI, 1996. Systemic migration of *Pseudomonas syringae* pv. *avellanae* in twigs and young trees of hazelnut and symptom development. *Journal of Phytopathology*, **144**, 215-219.
- SCORTICHINI M., 1998. Response of *Corylus avellana* L. germplasm to artificial inoculation with *Pseudomonas avellanae* (Psallidas) Janse et al. *Agricoltura Mediterranea*, **128**, 153-156.
- SCORTICHINI M., U. MARCHESI, L. ANGELUCCI, M.P. ROSSI, M.T. DETTORI, 2000. Occurrence of *Pseudomonas avellanae* (Psallidas) Janse et al. and related pseudomonads on wild *Corylus avellana* trees and genetic relationship with strains isolated from cultivated hazelnuts. *Journal of Phytopathology*, **148**, 523-532.

- SCORTICHINI M., U. MARCHESI, 2001. Sensitive and specific detection of *Pseudomonas avellanae* using primers based on 16S rRNA gene sequences. *Journal of Phytopathology*, **149**, 527-532.
- SCORTICHINI M., U. MARCHESI, P. DI PROSPERO, 2002. Genetic relatedness among *Pseudomonas avellanae*, *P.s.* pv. *theae* and *P.s.* pv. *actinidiae* and their identification. *European Journal of Plant Pathology*, **108**, 269-278.