

### **Evaluation of lentil genotypes for resistance to rust.**

GELETU BEJIGA, ABEBE TULLU, SEIFU TSEGAYE, SEID AHMED and YADETA ANBESSA

Alemaya University of Agriculture, Debre Zeit Agricultural Research Center, P.O. Box 32, Debre Zeit, Ethiopia.

A total of 268 lentil accessions were evaluated to identify rust (*Uromyces fabae*) resistant lines at the Debre Zeit Agricultural Research Center, Ethiopia. The lines were grown during two main seasons (July to November, 1990 and 1991) and one off-season (January to May, 1991). A rating scale of 1-9 disease severity was used to assess line reaction. The incidence of the disease was highest in the off-season. The results also showed that 58 lines had a rating of 1 (no disease) while some lines had ratings of 2, 3 and 4 (moderate to susceptible reactions). Lines ACC-36127, 87S-93549 and PGRC-1 were severely affected. Line 87S-93549 was the first to be hit by the disease before flowering. Those lines which showed resistance and good performance were tested for yield in 1992 in the Ethiopian highlands. The lines with rating of 1 are being used in a breeding programme for lentil resistance to rust.

**Key words:** *Lens culinaris*, Lentil, *Uromyces fabae*, Rust resistance.

### **Valutazione di genotipi di lenticchia per la resistenza alla ruggine.**

Un totale di 268 accessioni di lenticchia è stato valutato presso il Debre Zeit Agricultural Research Center, Etiopia, allo scopo di identificare linee resistenti alla ruggine (*Uromyces fabae*). La coltivazione di tali linee è stata effettuata durante due stagioni principali (da luglio a novembre, nel 1990 e 1991) e una fuori stagione (da gennaio a maggio 1991). Per la valutazione della risposta delle linee è stata adottata una scala di gravità della malattia da 1 a 9. L'incidenza della malattia è stata più elevata durante la coltivazione fuori stagione. I risultati hanno evidenziato inoltre che 58 linee hanno avuto un punteggio di 1 (assenza di malattia) mentre alcune linee hanno avuto punteggi di 2, 3 e 4 (reazione da moderata a suscettibile). Le linee ACC-36127, 87S-93549 e PGRC-1 sono state severamente colpite dalla malattia. La linea 87S-93549 è stata la prima a mostrare sintomi prima della fioritura. Le linee che hanno manifestato resistenza e buone qualità agronomiche sono state valutate, nel 1992, per la produttività sugli altopiani etiopici. Le linee con punteggio 1 sono utilizzate in un programma di miglioramento genetico della lenticchia per la resistenza alla ruggine

**Parole chiave:** *Lens culinaris*, Lenticchia, *Uromyces fabae*, Resistenza alla ruggine.

### **Tomato big bud disease in southern Italy and characterization of its causal agent by RFLP analysis.**

CARMINE MARCONE and ANTONIO RAGOZZINO

Istituto di Patologia Vegetale, Università di Napoli, Via Università 100, I-80055 Portici

Tomato big bud (TBB) was found infecting tomato plants of several cultivars and breeding lines in many tomato-growing areas in southern Italy. Affected plants show symptoms of stunting, proliferation of axillary shoots conferring the plant a bushy appearance, purple coloration, thickening of the apical stems which assume a stiff and erect position, uprolled leaf margins and virescent flowers. Flowering trusses often form dichotomously branched structures with papillae at the tips. The most characteristic symptom is the union and enlargement of sepal, resulting in a swollen calyx with a typical bladder form. Proliferation of adventitious roots from older parts of the stem breaking through the epidermis is present in many cases. Phytoplasmas were detected in big bud-diseased tomato plants by the combined use of fluorescence (DAPI) and electron microscopy (TEM) and PCR amplification of a phytoplasma 16S rRNA gene sequences. They were characterized by RFLP analysis of the amplified PCR-products using *AluI* restriction endonuclease. The restriction profile of phytoplasmas recovered from big bud diseased tomato plants was typical of aster yellows phytoplasma group and similar to that of phytoplasmas affecting several other vegetable crops and weeds in many growing areas of central-southern Italy

**Key words:** Phytoplasmas, 16S rRNA, PCR-amplification, Virescence, Aster yellows.

### **Rinvenimento della malattia "big bud" del pomodoro nell'Italia meridionale e caratterizzazione dell'agente causale mediante l'analisi del polimorfismo della lunghezza dei frammenti di restrizione (RFLP).**

La malattia "big bud" viene segnalata su varie cultivar e linee ibride di pomodoro in diverse aree di coltivazione di tale solanacea nell'Italia meridionale. Le piante affette mostrano sintomi di nanismo, proliferazione di getti ascellari che conferiscono alla pianta un aspetto affastellato, colorazione violacea, ispessimento degli internodi che assumono posizione rigida ed eretta, arrotolamento verso l'alto dei margini fogliari, virescenza dei fiori. Il palco fiorale spesso presenta strutture ramificate dicotomicamente con papille all'estremità. Il sintomo più caratteristico consiste nell'allargamento e saldatura dei sepali con la formazione di un calice tipicamente rigonfio. Proliferazione di radici avventizie dalle parti più vecchie dello stelo è frequentemente osservata. Fitoplasmi sono stati individuati nelle piante con sintomi di "big bud" mediante microscopia a fluorescenza (DAPI) ed elettronica (TEM) e tramite la reazione a catena della polimerasi (PCR). Essi sono caratterizzati mediante l'analisi del polimorfismo della lunghezza dei frammenti di restrizione (RFLP) di un frammento amplificato del gene che codifica la sintesi dell'RNA ribosomiale 16S, utilizzando l'enzima *AluI*. L'analisi di restrizione ha evidenziato un pattern tipico del gruppo aster yellows e simile a quello di fitoplasmi rinvenuti recentemente su varie specie spontanee e ortive in diverse aree coltivate dell'Italia centrale e meridionale.

**Parole chiave:** Fitoplasmi, 16S RNA, Amplificazione, Virescenza, Giallume dell'astro.

**Incontro annuale della Società Italiana di Patologia Vegetale**  
**Moderni indirizzi diagnostici in patologia vegetale**  
**Torino 28 - 29 ottobre 1994**

**Organizzato da:**

Facoltà di Agraria dell'Università di Torino

**Presentazione**

Questo volume raccoglie i testi delle relazioni e i riassunti delle comunicazioni presentate in occasione dell'Incontro annuale della Società Italiana di Patologia vegetale su "Moderni indirizzi diagnostici in patologia vegetale", organizzato dalla Facoltà di Agraria dell'Università di Torino il 28 e 29 ottobre 1994. L'importanza dell'argomento ha richiamato numerosi ricercatori e cultori della materia i cui contributi, con le discussioni che ne sono scaturite, hanno evidenziato i rivoluzionari progressi verificatisi in questi ultimi anni nel settore in seguito ad applicazioni sempre più frequenti di tecniche di biologia molecolare. La versatilità d'impiego e l'attendibilità dei risultati ne permettono l'applicazione ormai abituale in virologia vegetale sia nella ricerca di base sia nelle analisi di tipo massale. Anche nel caso della batteriologia e, più recentemente, della micologia fitopatologica le tecniche immunologiche e immunochimiche e quelle basate sull'analisi degli acidi nucleici (cariotipizzazione elettroforetica, analisi dei profili di restrizione, ibridazione degli acidi nucleici, reazioni a catena della polimerasi) o dei profili proteici o lipidici permettono di identificare in modo rapido e sicuro molti patogeni. Particolarmente significativo appare il fatto che anche in micologia i caratteri biochimici e fisiologici vadano assunto crescente importanza di sussidio ai caratteri morfologici nella classificazione dei funghi. Ci auguriamo vivamente che questo volume possa essere uno strumento di aggiornamento per tutti coloro che, ricercatori e tecnici, debbano affrontare problemi connessi al riconoscimento e alla diagnosi di patogeni delle piante.

**Il Comitato Organizzatore**

---

*Annual meeting of the Italian Society of Plant Pathology*  
*New trends in diagnosis in plant pathology*  
*Turin, Italy, October 28 - 29, 1994*

**Organized by:**

Facoltà di Agraria dell'Università di Torino

**Foreword**

*This issue contains the texts of the lectures and the summaries of the communications presented during the Annual Meeting of the Italian Society of Plant Pathology (SIPaV) on "New trends in diagnosis in plant pathology", organized by the Faculty of*

*Agriculture of the University of Turin, held at Turin, Italy, October 28 and 29, 1994. The importance of the topic attracted many researchers working on this subject and numerous plant pathologists willing to update their knowledge in such a fast moving area. The contributions and the discussions generated by them did highlight the astonishing progresses made during the past few years in this field, due to the increasing application of molecular techniques. The flexibility of such methods, and the reliability of the results achievable, permit their broad application in plant virology, both in basic research, and in routine analysis. Also in the case of bacteriology and, more recently, mycology, immunological techniques, together with biochemical and physiological methods and with nucleic acid-based techniques (electrophoretic karyotyping, RFLP, nucleic acid hybridization, PCR) permit quick and accurate diagnosis of many pathogens. It must be stressed that also in mycology the biochemical and physiological characters are increasingly associated to the morphological observations in taxonomic studies.*

*We sincerely hope that the researchers and technicians who are involved in the diagnosis of plant pathogens will recognize this issue as a useful and updated tool in their daily work.*

### ***The Organizing Committee***

---

Petria 5(3), 211-230, (1995) Rassegna/Review

## **Moderne tecniche diagnostiche in virologia vegetale**

DONATO GALLITELLI<sup>1</sup> e DONATO BOSCIA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Protezione delle Piante dalle Malattie, Università degli Studi, e

<sup>2</sup> Centro di Studio del CNR sui Virus e le Virosi delle Colture Mediterranee, Via Amendola, 165/A, I-70126 Bari

Viene presentata una breve rassegna delle tecniche moderne di laboratorio più utilizzate in virologia vegetale a fini diagnostici. Caratteristica comune alle metodiche descritte è quella di costituire una promettente alternativa ai più lunghi e costosi saggi biologici. Diagnosi sierologica. Basata sull'utilizzo di anticorpi, le cui prime applicazioni in virologia vegetale risalgono ad oltre quarant'anni addietro, è stata progressivamente rinnovata grazie alle applicazioni immunoenzimatiche (ELISA), alla messa a punto di sistemi di amplificazione ad alla preparazione di anticorpi monoclonali. L'ELISA è un saggio su fase solida in cui anticorpi specifici agiscono in successione intrappolando dapprima e poi rivelando le particelle virali. L'ELISA può essere condotta in forma diretta o indiretta; nel secondo caso è possibile utilizzare un coniugato universale cioè non specifico per il virus, ma in grado di riconoscere anticorpi virus-specifici preparati in uno stesso animale. L'ELISA offre la possibilità di una diagnosi sia qualitativa che quantitativa. Particolarmente promettente risulta l'affiancamento di tecniche molecolari all'ELISA (PCR con immunocattura) che permette di utilizzare in uno stesso saggio tanto la versatilità delle tecniche molecolari quanto la sensibilità dei sistemi immunoenzimatici. Parallelamente all'ELISA vengono oggi impiegati altri saggi su fase

solida che permettono l'uso della sierologia su estratti grezzi o su sezioni di organi di materiale vegetale. Gli anticorpi monoclonali rappresentano l'aspetto più innovativo della diagnosi sierologica applicata alla virologia vegetale. Tali reagenti sono particolarmente utili per la diagnosi di virus difficilmente purificabili e per i quali risulta difficoltoso ottenere quantitativi apprezzabili di antisieri policlonali. L'uso di anticorpi monoclonali permette di conseguire: a) un miglioramento della specificità del saggio, b) la riproducibilità dei risultati, c) la disponibilità illimitata del reagente, d) la facilità di immunizzazione, e) la possibilità di selezionare reagenti con elevata affinità. A fronte di questi innegabili vantaggi, gli anticorpi monoclonali presentano una serie di svantaggi che in alcuni casi possono comprometterne l'uso, specie se la messa a punto del reagente non è stata preceduta da un'attenta sperimentazione; essi sono: a) eccesso di specificità, b) saggio-specificità, condizioni chimico-fisiche del saggio troppo limitate. Vengono infine ricordate le possibilità di impiego degli anticorpi in immunomicroscopia elettronica (ISEM).

**Diagnosi molecolare.** Le tecniche molecolari che utilizzano le proprietà degli acidi nucleici virali sono in rapida affermazione in virologia vegetale in quanto la versatilità d'uso e l'attendibilità dei risultati ne permettono l'impiego come strumento di ricerca di base e di diagnosi e analisi massale. La possibilità di esplorare a fini diagnostici e/o identificativi l'intero genoma virale e non la sola porzione codificante la proteina capsidica rappresenta in definitiva il punto di forza di queste tecniche nei confronti di quelle sierologiche. La sierologia può infatti trovare serie limitazioni nel caso del rilevamento di: (a) virus instabili, (b) virus con scarso potere immunogeno, (c) virus per i quali è difficile ottenere preparati purificati, (d) virus con basso titolo nell'ospite naturale e non trasmissibili meccanicamente, (e) RNA bi e monocatenari non incapsidati, (f) particelle virali difettive, (g) RNA difettivi-interferenti (DI) o RNA satelliti, (h) viroidi, (i) ceppi di virus sierologicamente assai prossimi o indistinguibili. Le tecniche molecolari hanno completamente rivoluzionato i criteri di studio e la diagnosi dei virus ad RNA monocatenario poiché permettono di sintetizzare e clonare copie degli RNA virali sotto forma di DNA complementare (cDNA) e di manipolare ed adattare ad usi specifici i cloni ottenuti impiegando enzimi che potrebbero essere utilizzati su molecole di RNA. La versatilità di impiego è forse l'aspetto più interessante delle sonde molecolari. Da uno stesso clone si possono infatti sintetizzare sonde di lunghezza e specificità desiderate, caratteristica quest'ultima, che si presta ad ulteriori adattamenti a seconda della "stringenza" delle condizioni di impiego. Vengono illustrate l'ibridazione molecolare e la PCR, tecniche oggi diffusamente impiegate in virologia vegetale. Le attuali tendenze di sviluppo della diagnosi molecolare sono: a) ridurre i rischi per l'operatore, b) allungare i tempi entro cui la sonda marcata può essere utilizzata, c) ridurre i costi, d) preparare corredi commerciali destinati a più di un campo di applicazione.

**Parole chiave:** Fitovirus, Diagnosi sierologica, Diagnosi molecolare.

### **Modern diagnostic techniques in plant virology.**

The potential of recent development of serological and molecular techniques applied to plant virus identification and diagnosis are briefly outlined. The techniques seem promising in avoiding biological tests that are costly and time and labour consuming.

Serological diagnosis. Since the first application, i.e. more than 40 years ago, serological precipitin reactions are widely used to facilitate plant virus identification and diagnosis. However, numerous alternative and sensitive strategies (immunoenzymatic assays, system of application, monoclonal antibodies) have been developed over the years making serology a routine tool for the detection of many plant pathogenic viruses and for large-scale testings. ELISA is the most widely adopted immunoenzymatic assay performed onto a solid support (polystyrene microplates) where virus-specific antibodies trap and then reveal the target (virus particles) through an enzymatic reaction. To overcome preparation of virus-specific antibody-enzyme conjugates, the enzyme used in the final detection step can be an antiglobulin antibody; this is often referred to as "universal conjugate". ELISA can be readily adapted to both qualitative and quantitative measurements in purified virus preparations and crude extracts. In parallel to ELISA other solid phase-based serological procedures and amplification systems have been developed. Most of them seem fast and sensitive enough to be adopted more and more frequently in the near future. Monoclonal antibodies (MAbs) are now available against a large number of plant viruses representing the most innovative reactants for a serologically-based diagnosis. Compared to conventional polyclonal antisera, the main advantages of MAbs are: (i) increased specificity to select antibodies of high affinity, (ii) reproducibility of serological tests in different laboratories, (iii) unlimited availability, (iv) use of antigen preparations that are contaminated by other viruses or by host constituents; this is particularly useful with viruses that are difficult to purify. The main limitations on the use of MAbs are also reported: (i) too specific for the task, (ii) assay-specific, i.e. do not necessarily function well in every type of immunoassay, (iii) restricted range of chemico-physical requirements. The suitability of immuno-sorbent electron microscopy (ISEM) in plant virus diagnosis and identification is also discussed. Molecular diagnosis. Since the molecular approach to plant virus diagnosis capitalises on genetic information it overcomes some of the constraints of the classical biological and serological techniques. Serology is a technique that explores the differential immunological properties of the viral coat protein which represents only a small part of coding capacity of the viral genome. Therefore serology finds serious limitations when applied to: (i) unstable or poorly immunogenic viruses, (ii) viruses requiring laborious purification procedures, (iii) detection of non encapsidated double stranded or single stranded RNAs, (iv) detection of defective virus particles, defective interfering RNAs or satellite RNAs, (v) detection of viroids (e.g. infective agents deprived of coat protein), (vi) differentiation of very closely related virus strains. The recombinant DNA technology has helped overcoming many of the above problems through the application of nucleic acid hybridisation techniques using cloned molecular probes. This was particularly relevant for RNA plant viruses as its complementary DNA can be cloned and manipulated with enzymes and procedures that cannot be applied to RNA molecules. Molecular techniques are suitable, versatile and highly sensitive tools to be adopted for plant virus diagnosis and identification. The currently used techniques of molecular hybridization and polymerase chain reaction (PCR) are briefly outlined. In the near future, it will be expected that such methods will be adapted: (i) to simultaneously detect of different viruses in the same sample, (ii) to reduce costs and risks for the operator.

**Key words:** Plant viruses, Serological diagnosis, Molecular diagnosis.

## **Moderne tecniche diagnostiche in fitobatteriologia.**

UMBERTO MAZZUCCHI

Istituto di Patologia Vegetale dell'Università, Via F. Re, 8, I-40126 Bologna

Le tecniche diagnostiche in fitobatteriologia hanno lo scopo di accertare la presenza di procarioti fitopatogeni in materiali vegetali sintomatici ed asintomatici. Le tecniche possono essere applicate direttamente sul campione vegetale od alle colture pure del procariote, non ancora ottenibili nel caso dei fitoplasmii. Tutte le tecniche prevedono l'identificazione del procariote in base ad impronte patogeniche, metaboliche e molecolari. Ogni impronta è un insieme di pochi caratteri differenziali e ponderati. Le impronte patogenetiche comprendono i risultati di prove di patogenicità sull'ospite vegetale omologo a dose d' inoculo differenziale o su una gamma di ospiti predeterminati; esse richiedono l'uso delle colture pure ed i tempi di risposta non sono sempre compatibili con la formulazione di una diagnosi rapida. Anche la determinazione del lisotipo può essere inclusa tra le impronte patogenetiche. Le impronte metaboliche comprendono i cosiddetti profili nutrizionali, oltre ai tradizionali caratteri fisiologici; i sistemi più noti sono API e Biolog; nel sistema più usato, Biolog, l'identificazione è corretta a livello di specie, ma non a livello infraspecifico, dove la affidabilità è assai condizionata da una appropriata banca dati. Le impronte molecolari possono riguardare la presenza di certi determinanti antigenici, i profili degli esteri metilici degli acidi grassi dei lipidi cellulari, i profili elettroforetici delle proteine cellulari totali e la presenza di peculiari sequenze nucleotidiche. Le tecniche immunologiche prevedono l'uso di antisieri monospecifici, anticorpi monoclonali, oltre agli antisieri tradizionali; gli anticorpi monoclonali possono essere specifici a livello supraspecifico od infraspecifico. I profili gas-cromatografici degli acidi grassi sono da ritenersi attualmente il metodo più rapido ed accurato per la identificazione dei procarioti fitopatogeni ottenibili in coltura pura; il sistema MIDI più usato permette l'identificazione a livello di genere, specie e talora anche di patovar e di sottospecie; noti certi picchi, marcatori specifici, è possibile applicare con successo la tecnica direttamente a campioni vegetali. I profili elettroforetici delle proteine totali sono già usati da un decennio per la identificazione a livello specifico dei procarioti fitopatogeni in coltura pura; in certi casi è possibile discriminare sottospecie e patovar per tratti minimi, peculiari e riproducibili; per la comparazione dei profili è assai valido il sistema Gel Compar TM. Le impronte nucleotidiche sono costituite da peculiari sequenze degli acidi nucleici (più spesso DNA) possedute dal procariote bersaglio, rilevabili senza amplificazione mediante appropriate sonde marcate o con amplificazione della stessa sequenza bersaglio, della sonda o del segnale di amplificazione. Il rilevamento e l'identificazione dei procarioti fitopatogeni mediante impronte nucleotidiche, usato sempre più frequentemente negli ultimi cinque anni, è il principale oggetto di questa rassegna. L'amplificazione della sequenza bersaglio attraverso la reazione a catena della polimerasi (PCR) è il metodo più comunemente usato; la diagnosi delle fitoplasmosi e l'identificazione dei loro agenti causali è il settore dove più proficuo è stato l'uso della

PCR parimenti a quanto è avvenuto in medicina umana per certi patogeni non ottenibili in coltura pura; variazione nella PCR già usata con successo in fitobatteriologia è la PCR riciclata (RPCR); il potere di risoluzione delle tecniche di amplificazione è aumentato quando si effettua l'analisi degli amplificati con enzimi di restrizione (RFLP) e con sequenziamento. Comparando le sequenze degli amplificati del DNA 16S è stato possibile valutare le distanze evolutive dei principali fitoplasmi ed individuare 5 gruppi omogenei; anche la reazione a catena della ligasi (LCR) è stata recentemente proposta come tecnica diagnostica.

**Parole chiave:** Fitobatteriologia, Procarioti fitopatogeni, Batteri fitopatogeni, Batteri fastidiosi, Fitoplasmi, Diagnosi, Identificazione, Impronte, Reazione a catena della polimerasi, Reazione a catena della polimerasi riciclata, Reazione a catena della ligasi.

### **Modern diagnostic techniques in phytobacteriology.**

The diagnostic techniques used in phytobacteriology are designed to determine the presence of phytopathogenic prokaryotes in symptomatic and symptomless plant material. They can be applied directly on the plant sample or pure culture, which is not yet available for phytoplasmas. All the techniques involve the identification of the prokaryote on the basis of pathogenic, metabolic and molecular fingerprints. Each fingerprint is a series of a few differential and weighted traits. The pathogenic fingerprints are the result of pathogenicity tests on homologous host plants, with differential inoculum doses, or on a predetermined range of host plants; pure cultures must be used and the response time is not always compatible with a rapid diagnosis; lysotype determination can also be considered a pathogenic fingerprint. The metabolic fingerprints include the so-called nutritional profiles, as well as the traditional physiological traits; the most popular systems are API and Biolog; with the latter, most commonly used, identification is correct at the species level, but not at the infrasubspecific level, where reliability depends heavily on an appropriate data bank. The molecular fingerprints can include certain antigenic determinants, methyl ester fatty acid profiles of cell lipids, total cell protein electrophoretic profiles and particular nucleotide sequences. The immunological techniques involve the use of monospecific antisera, monoclonal antibodies, as well as traditional antisera; the monoclonal antibodies may be specific at a supraspecific or infrasubspecific level. The fatty acid gas-chromatography profiles are currently the most rapid and accurate method for identifying phytopathogenic prokaryotes available in pure culture; the MIDI system, most frequently used, allows identification at genus, species and sometimes also at pathovar and subspecies level; on the basis of known specific marker peaks, this technique can be successfully applied directly to plant samples. The protein electrophoretic profiles have been used for the last ten years to identify at a specific level phytopathogenic prokaryotes available in pure culture; in some cases it is possible to distinguish between subspecies and pathovars on the basis of minimum, peculiar and reproducible traits; the Gel Compar TM system is very useful for profile comparison. The nucleotide fingerprints consist of peculiar nucleic acid sequences (more often DNA) of the target prokaryote, which can be detected without amplification with appropriate labelled probes or with amplification of the target sequence, the probe or the amplification signal. The detection and identification of phytopathogenic prokaryotes

with nucleotide fingerprints, increasingly used over the last five years, is the main topic of this paper. Amplification of the target sequence with polymerase chain reaction (PCR) is one of the most popular methods. Diagnosis of phytoplasmoses and identification of the causal agents has benefited considerably from the use of PCR just as in human medicine for certain pathogens not available in pure culture; a variation of PCR, used with success in phytobacteriology, is recycled PCR (RPCR); the resolution of amplification techniques is enhanced when the amplified products are analyzed with restriction enzymes (RFLP) and sequencing; comparison of sequences of 16S DNA amplified products makes it possible to assess the evolutive distances of the main phytoplasmas and identify 5 homogeneous groups; ligase chain reaction (LCR) has also been recently proposed as a diagnostic technique.

**Key words:** Phytobacteriology, Phytopathogenic procaryotes, Phytopathogenic bacteria, Fastidious bacteria, Phytoplasmas, Diagnosis, Identification, Fingerprints, Polymerase chain reaction, Recycled polymerase chain reaction, Ligase chain reaction.

---

Petria 5(3), 261-298, (1995) Rassegna/Review

### **Moderne tecniche diagnostiche in micologia fitopatologica**

GAETANO MAGNANO DI SAN LIO<sup>1</sup>, FELICE SCALA<sup>2</sup> e QUIRICO MIGHELI<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Istituto di Didesa delle Piante, Università di Reggio Calabria, Piazza S. Francesco di Sales, 4, I-89061 Gallina (RC)

<sup>2</sup>Istituto di Patologia vegetale, Università di Napoli, Via Università, 100, I-80055 Portici (NA)

<sup>3</sup>Dipartimento di Valorizzazione e Protezione delle Risorse Agroforestali, Università di Torino, Via Pietro Giuria, 15, I10126 Torino

Per l'identificazione dei funghi fitopatogeni, in aggiunta ai criteri morfologici su cui si basa l'attuale classificazione, vengono sempre più largamente utilizzati metodi immunologici e biochimici. Tra i metodi di diagnosi attualmente in uso in fitopatologia, questa rassegna prende in esame l'elettroforesi delle proteine totali e degli isoenzimi, l'immunodiagnosi e le tecniche basate sull'analisi degli acidi nucleici. L'elettroforesi delle proteine miceliari e degli isoenzimi, le cui prime applicazioni nella diagnostica fitopatologica risalgono agli anni '60, viene utilizzata in numerosi laboratori di micologia ed è anche uno dei metodi ufficiali di controllo dei servizi di quarantena del Governo Federale negli Stati Uniti d'America. Il supporto più usato per l'elettroforesi delle proteine totali è la poliacrilammide, mentre per l'analisi degli isoenzimi vengono preferiti i gel di amido. Il profilo elettroforetico delle proteine totali viene utilizzato prevalentemente per l'identificazione degli isolati a livello di specie. L'elettroforesi degli isoenzimi ha numerose applicazioni, tra cui l'identificazione di specie patogene, lo studio della struttura genetica di popolazioni, la tassonomia, l'analisi genetica e gli studi sulla condizione nucleare o il livello di ploidia dei patogeni. L'elettroforesi degli isoenzimi, inoltre, è stata utilizzata di recente per diagnosticare la presenza dei patogeni fungini direttamente nei tessuti delle piante infette. Le tecniche immunologiche per l'identificazione di patogeni fungini si sono sviluppate notevolmente in questi ultimi anni, grazie soprattutto alla possibilità di produrre anticorpi monoclonali. Il metodo più affermato è quello ELISA che viene applicato per l'identificazione e la determinazione

quantitativa di numerosi funghi fitopatogeni sia in coltura pura sia nei tessuti delle piante infette e nel terreno. Altre tecniche immunologiche utilizzate nella diagnostica fitopatologica sono il Western-blotting e l'immunofluorescenza. Per i saggi in campo sono state sviluppate tecniche immunologiche molto semplici e rapide del tipo dot-blot e dip-stick e sono stati messi in commercio kit basati sul metodo ELISA. È probabile che in futuro verranno sviluppati nuovi saggi immunodiagnostici basati su anticorpi monoclonali più specifici, prodotti con metodi diversi quali le tecniche di arricchimento, la tollerizzazione immunologica o la trasformazione genetica di colture batteriche. Le tecniche diagnostiche più recenti sono quelle basate sull'analisi degli acidi nucleici. Sebbene il loro impiego nella diagnostica fitopatologica sia ancora limitato, alcune di esse appaiono molto promettenti, essendo estremamente sensibili e specifiche. La cariotipizzazione elettroforetica e l'analisi dei profili di restrizione del DNA sono state utilizzate per ricerche epidemiologiche o per studi sulla evoluzione delle popolazioni di funghi patogeni. Un metodo più sensibile è quello della ibridazione degli acidi nucleici, che si basa sull'impiego di sonde molecolari per individuare sequenze specifiche di DNA. Per la diagnosi di funghi fitopatogeni sono state utilizzate sia sonde omologhe che eterologhe. Molti degli svantaggi delle tecniche diagnostiche basate sull'ibridazione degli acidi nucleici sono stati superati con il metodo della reazione a catena della polimerasi (PCR). Di questa esistono numerose varianti, quali la RAPD (random amplification of polymorphic DNA), la AP-PCR (arbitrary primed polymerase chain reaction), la DAF (DNA amplification fingerprinting) o la DAMD (directed amplification of minisatellite-region DNA). L'automatizzazione dell'analisi dei prodotti di amplificazione degli acidi nucleici così ottenuti potrà contribuire ad una più larga applicazione di queste tecniche nella diagnostica fitopatologica.

**Parole chiave:** Elettroforesi delle proteine, Isoenzimi, Tecniche immunologiche, Analisi degli acidi nucleici.

### **Modern diagnostic techniques in phytopathological mycology**

Immunological and biochemical methods are more and more employed to identify fungal pathogens in addition to the morphological criteria on which the classification of fungi is founded. Among the diagnostic methods utilized presently in phytopathology this review deals with the electrophoresis of total proteins and isoenzymes, the immunodiagnosis and the techniques based on the analysis of nucleic acids. The electrophoresis of mycelial proteins and isoenzymes, whose first applications in phytopathology date back to the 1960s, is used in many mycological laboratories and is one of the official tests utilized by the quarantine services in the USA. Generally polyacrylamide gels are utilized for the electrophoresis of total proteins, while starch gels are preferred for the electrophoresis of isoenzymes. The electrophoretic profile of total proteins is mainly used for the identification of the isolates at the species level. The isoenzymes electrophoresis is applied for several purposes, including the identification of pathogenic species, the study of the genetic structure of pathogen populations, taxonomy, the genetic analysis and the study of the nuclear condition or the ploidy level of pathogens. Recently the isoenzyme electrophoresis has been utilized to diagnose fungal infections directly in plant tissues. The immunological techniques for the identification of fungal pathogens have been considerably developed in recent years

mainly due to the possibility of producing monoclonal antibodies. The most successful method is the ELISA which is applied for the identification of numerous phytopathogenic fungi either in pure culture or in infected plant tissues and soil. Other immunological techniques utilized for the diagnosis of plant diseases are the Western-blotting and the immunofluorescence. Very simple and rapid immunological techniques have been developed for field tests, including dot-blot, dip-stick, and commercial ELISA based kit. Probably in the future new immunological tests will be developed, based on more specific monoclonal antibodies produced with different methods such as the immunological tolerization and the genetic transformation of bacterial cultures. The most recent diagnostic techniques are based on the analysis of nucleic acids. Their use for the diagnosis of plant diseases is presently limited even though some appear extremely sensitive and specific. The electrophoretic caryotyping and the analysis of DNA restriction fragment length polymorphism have been used for epidemiological research or studies on the evolution of pathogenic fungi populations. A more sensitive method is the nucleic acid hybridization, based on molecular probes which recognize specific DNA sequences. Both homologous and heterologous probes have been used for the diagnosis of fungal pathogens. Many of the inconveniences of the diagnostic techniques based on nucleic acid hybridization have been eliminated using the polymerase chain reaction (PCR) amplification method. Diverse types of PCR may be performed, including RAPD (random amplification of polymorphic DNA), AP-PCR (arbitrary primed polymerase chain reaction, DAF (DNA amplification fingerprinting) or DAMD (directed amplification of minisatellite-region DNA). The introduction of the automatic analysis of the products of the amplification of the nucleic acids will contribute to a more widespread diffusion of these techniques for the diagnosis of plant diseases.

**Key words:** Protein electrophoresis, Isozymes, Immunological techniques, Nucleic acid analysis.

<i>Lavori presentati/Presented papers</i>	<i>pagina/pages</i>
BARBA M., P. DEL SERRONE, C. MINUCCI, G. BOCCARDO, M. <b>CONTI Diagnosi molecolare di fitoplasmi della vite.</b>	299
BERTACCINI A., G. ALBANESE <b>Tecniche molecolari per la diagnosi e la caratterizzazione dei fitoplasmi.</b>	301
BIANCO P.A., R.W. HOMMOND, P. CASATI. <b>Identificazione, mediante sonde molecolari, del viroide dell'affusolamento del tubero di patata in Lombardia</b>	302
PASQUINI G., M. BARBA <b>Caratterizzazione sierologica di isolati italiani in plum pox potyvirus.</b>	303
MASILANO G., G. FIRRAO, R. LOCCI. <b>Sonde oligonucleotidiche per la identificazione e il differenziamento di MLO.</b>	304
VIBIO M., I. CAMELE, A. BERTACCINI, G.L. RANA, V.	305

<b>D'ALOSIO. Individuazione d'infezione da fitoplasmi in cipolla mediante amplificazione genica (PRC).</b>	
SALDARELLI P., L. BARBAROSSA, F. GRIEGO, D. GALLITELLI. <b>Impiego di ribosonde chemiluminescenti nella certificazione sanitaria del pomodoro.</b>	307
TESSITORI M., L. LEVY, G. ALBANESE, R. LA ROSA, A. HADIDI. <b>Diagnosi simultanea d'infezioni miste di viroidi in piante di agrumi mediante MRT-PCR.</b>	308
SCORTICHINI M. <b>Variabilità del profilo proteico e della capacità di assimilazione di carboidrati di un isolato di <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lachrymans</i> accresciuto in differenti ambienti</b>	309
BRAGALONI M., N. ANSELMI. <b>Identificazione di specie di <i>Armillaria</i> mediante profili isoenzimatici.</b>	310
CRISTINZIO G. <b>La perdita elettrolitica causata da filtrati colturali come tecnica rapida per evidenziare resistenze a funghi fitopatogeni.</b>	310
GRIMALDI V., A. CATARA. <b>Analisi della variabilità del dsRNA di isolati ipovirulenti di <i>Cryphonectria parasitica</i> mediante PCR e RFLP.</b>	312
GOBBI E., R. LOCCI. <b>Caratterizzazione intraspecifica di ceppi di <i>Cryphonectria parasitica</i> mediante RFLP del DNA mitocondriale</b>	313
MORICCA S., A. RAGAZZI. <b>Diagnosi mediante PCR dell'agente di avvizzimento del cotone, <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i>, nei tessuti dell'ospite.</b>	314