

PROTOCOLLO ARMONIZZATO PER LA DIAGNOSI DI *RALSTONIA SOLANACEARUM* IN PIANTE E TUBERI DI PATATA

C. MESSINA, E. STEFANI, U. MAZZUCCHI

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali, Università degli Studi
via Filippo Re, 8 – 40126 Bologna

RIASSUNTO

Ralstonia solanacearum è un organismo nocivo a tolleranza fitosanitaria zero, oggetto della Direttiva UE di lotta del Consiglio delle Comunità Europee 98/57. La razza 3 (biovar 2) patogena per la patata, il pomodoro e la melanzana è di preminente interesse per gli stati della UE e per i paesi circummediterranei. Pianta spontanee, solanacee o non, possono essere ospiti secondari. La introduzione e la disseminazione in nuove aree ha luogo principalmente attraverso il commercio dei tuberi di patata, da tavola e da seme, dove le infezioni possono essere palesi o latenti. Rischi di disseminazione è offerto anche dai mezzi di trasporto contaminati. La Direttiva prescrive che i Servizi Fitosanitari degli Stati UE attuino un sistematico monitoraggio delle proprie produzioni di patata e del loro territorio incluse le acque superficiali e i liquidi di scarico delle industrie che lavorano e trasformano le patate.

In questo lavoro si descrive il protocollo che i Servizi Fitosanitari Europei devono seguire per effettuare diagnosi corrette delle infezioni palesi o latenti conformemente agli allegati della secondo la Direttiva UE

Parole chiave: marciume bruno, patata, melanzana, pomodoro, *Pseudomonas solanacearum*

SUMMARY

STANDARD DIAGNOSTIC PROTOCOL *RALSTONIA SOLANACEARUM*

Ralstonia solanacearum is a harmful organism with zero phytosanitary tolerance, described in the UE control Directive 98/57. Race 3 (biovar 2), pathogenic in potato, tomato and eggplant is of most concern for the UE States and the countries in the Mediterranean area. Wild plants, whether solanacee or not, may be secondary hosts. Introduction and spreading to new areas generally occurs with the trade of ware and seed potatoes, where infections may be apparent or latent. Transport vehicles offer other spreading risks. The EU Directive prescribes that the Phytosanitary Services in the various States set up a systematic monitoring system for their potato production throughout their territory, including surface waters and potato processing industry waste waters. This paper describes the protocol which must be followed by the European Phytosanitary Services for the correct diagnosis of apparent and latent infections in accordance with the Annexes to the second EU Directive.

Key words: brown rot, potato, eggplant, tomato, *Pseudomonas solanacearum*

INTRODUZIONE

Ralstonia solanacearum (Smith) Yabuuchi *et al.* (*R. solanacearum*) è un organismo nocivo, oggetto di legislazione fitosanitaria incluso in allegato I, parte A, Sez. II del D.M. 31 Gennaio 1996 tra quelli di cui è nota la presenza sul territorio comunitario e che riveste importanza per tutta la comunità. La sua introduzione e diffusione è vietata in tutti gli Stati Membri della Unione europea se presente su qualsiasi materiale o prodotto vegetale, nonché qualsiasi oggetto. *R. solanacearum* è una specie complessa suddivisa in razze in base alla natura delle piante ospiti. La razza 3 (Biovar 2) patogena per la patata è quella di prevalente interesse per le diagnosi dei paesi mediterranei e degli stati Membri della Unione Europea. La razza 3 causa il marciume bruno della patata e l'avvizzimento del pomodoro, della melanzana e di altre solanacee ospiti, spontanee e coltivate. *R. solanacearum* è oggetto di una Direttiva di lotta del Consiglio della Comunità Europea (Dir. 98/57) nel cui allegato I è descritto dettagliatamente il protocollo di diagnosi. Un protocollo ormai obsoleto è stato pubblicato nel 1990 (EPPO, 1990). Mentre scriviamo l'Italia sta per recepire suddetta direttiva di lotta sotto forma di regolamento che dovrà essere applicato in tutto il territorio italiano.

Campionamento

Si rende necessario per i monitoraggi sistematici che i Servizi Fitosanitari Regionali devono compiere ogni anno sulle proprie produzioni di patate e sul loro territorio. Principali oggetti di campionamento sono piante e tuberi in campo, tuberi raccolti o conservati, acque superficiali (canali, fiumi), acque di scarichi industriali (industrie di lavorazione delle patate), materiali vari dei magazzini o dei mezzi di trasporto, plantule di vivaio e piante spontanee ospiti potenziali. La diversa natura degli oggetti comporta impossibilità di un unico protocollo di campionamento. Nessun metodo di campionamento è citato nella Direttiva. La scelta del protocollo di campionamento è affidata ai Servizi Fitosanitari. I campioni vanno soggetti ad ispezioni visive ed eventualmente ad analisi batteriologiche nel caso di materiali vegetali, esclusivamente ad analisi batteriologiche negli altri casi. Per i tuberi di patata si è più spesso accettato che l'unità di ispezione sia costituita da 200 tuberi ogni 25 tonnellate. Per approntare l'unità di ispezione è necessario raccogliere i tuberi da un numero di sacchi variabile in rapporto alla entità del lotto, al numero di lotti distinti e al tipo di patata (da seme o da consumo). L'unità di campionamento è costituito da 5 sacchi fino a 50 tonnellate e da un sacco ogni 10 tonnellate fino a 200 tonnellate. Da ognuno dei sacchi della unità di campionamento si prelevano a caso tuberi in modo da costituire la unità di ispezione. La unità di ispezione dovrebbe essere scelta in base alla probabilità (es. 0,95) di trovare una certa percentuale di tuberi malati e visivamente riconoscibili nel lotto. Per tuberi asintomatici si accetta che l'unità di ispezione sia di 200 tuberi anche per il rilevamento delle infezioni latenti; in tal caso anche la soglia di sensibilità del metodo di analisi condiziona la probabilità di rilevare una data percentuale di tuberi infetti. Fatte le ipotesi appropriate, la probabilità di rilevare *R. solanacearum* in un lotto è equivalente a quella di aver campionato almeno un singolo tubero infetto che a sua volta dipende dalla percentuale di tuberi infetti nella unità campione. La probabilità (P) di rilevare una certa percentuale (p) di tuberi infetti in una unità campione di n tuberi è uguale a $1 - e^{-np}$.

Tecniche di rilevamento in materiale vegetale sintomatico.

Sintomi nella pianta e nel tubero di patata

Inizialmente si osserva una perdita temporanea di turgore delle foglie nella parte superiore della pianta, durante le ore più calde del giorno e, dopo alcuni giorni, l'appassimento diventa

irreversibile e porta alla morte della pianta. Nei tuberi la fase iniziale dell'infezione si può riconoscere con taglio trasversale osservando un'alterazione da giallo vitreo a bruno dell'anello vascolare, da cui fuoriesce spontaneamente un'essudato color crema. Nelle fasi avanzate dell'infezione l'essudato batterico può fuoriuscire dall'ombelico e dagli occhi, attorno ai quali causano aree bruno-rossastre di marciume leggermente infossate a cui rimangono adese particelle di terreno.

Saggio rapido preliminare

La presenza di *R. solanacearum* nei fusti di patata aventi foglie flaccide può essere accertata tagliando lo stelo appena sopra il livello del suolo e immergerlo verticalmente per un paio di centimetri in un bicchiere contenente acqua. Tenendo fermo e verticale il segmento, dopo pochi minuti si potrà osservare la caduta verso il basso di sottili filamenti biancastri fuoriuscenti dalla superficie di taglio.

Isolamento diretto

Rimuovere una piccola quantità di essudato dall'anello vascolare della patata e sospenderlo in alcuni ml di acqua distillata sterile. Preparare almeno due diluizioni decimali 1:10 e 1:100 ed inseminare delle piastre contenenti il substrato al tetrazolio di Kelman (Kelman, 1954) o il substrato SMSA (Elphinstone *et al.*, 1996) con circa 10-15 μ l delle sospensioni ottenute. Mantenere le piastre in incubazione per 3 giorni a 28°C ed osservare lo sviluppo di colonie virulente del patogeno. Sul substrato di Kelman gli isolati virulenti di *R. solanacearum* sviluppano colonie fluide, irregolari, piatte, bianco-latte, con leggere striature di color rosso sangue al centro; sul substrato SMSA gli isolati virulenti sviluppano colonie di color bianco-latte, piatte, irregolari e fluide con centri distinti di color rosso sangue che mostrano striature e vortici interni. Purificare le colonie con morfologia caratteristica mediante subcolture su un terreno nutritivo generale, per esempio saccarosio-peptone-agar (SPA) ed identificarle con il saggio PCR e/o l'analisi del profilo delle proteine cellulari.

Tecniche di rilevamento in materiale vegetale asintomatico.

Esse hanno lo scopo di rilevare le infezioni latenti nei tuberi di patata mediante uno più saggi di selezione preliminare con cui si possono eliminare i campioni negativi e concentrare l'attività di analisi sui restanti potenzialmente positivi procedendo all'isolamento del patogeno e, in questo caso, all'identificazione delle colture pure. L'unità di analisi consta di 200 tuberi.

Preparazione del campione per i saggi

Per favorire la moltiplicazione di basse popolazioni di *R. solanacearum* mantenere il campione in incubazione a 25-30°C per un massimo di due settimane. Lavare i tuberi ed asciugarli all'aria. Con un pelapatate rimuovere l'epidermide del tubero in corrispondenza dell'ombelico e prelevare un frammento a forma di cono del tessuto vascolare sottostante (3-5 mm di diametro). Durante questa fase si può effettuare un esame visivo dei tuberi, avendo cura di riporre ed analizzare singolarmente eventuali tuberi sintomatici. Trasferire i 200 coni ombelicali in sacchetti da Stomacher e schiacciare accuratamente con un martello fino ad ottenere una poltiglia omogenea. Aggiungere un adeguato volume di acqua distillata sterile (30-50 ml) e lasciar decantare per 15-30 minuti. Filtrare delicatamente con garza sterile e raccogliere il filtrato in provette da centrifuga e centrifugare a 10.000 g per 10 minuti alla temperatura di 10°C. Scartare il supernatante e risospendere il sedimento con 1 ml di acqua distillata sterile (concentrato finale). Esso va diviso in due parti uguali: usare subito una metà per i saggi preliminari e aggiungere all'altra 20-25% di glicerolo sterile, agitare al vortex e conservare a -20°C per alcune settimane o a -70°C per diversi mesi.

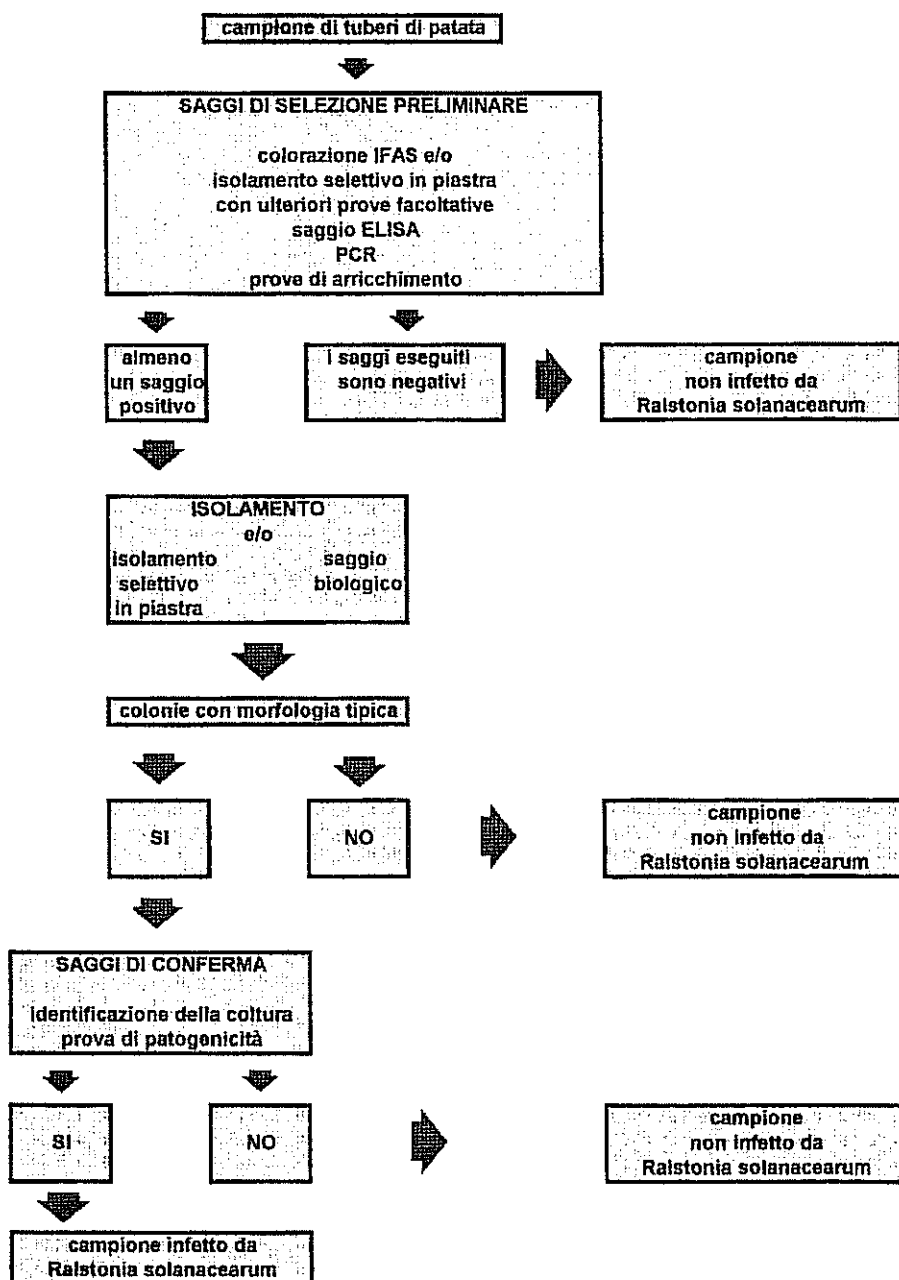


Figura 1: Diagramma di flusso per il rilevamento ed identificazione di *Ralstonia solanacearum* in campioni di tuberi di patata.

Colorazione di immunofluorescenza (IF)

E' raccomandata per la sua affidabilità e la apprezzabile soglia di sensibilità pari a 10^3 - 10^4 cellule per ml di concentrato finale. Critica per l'affidabilità del saggio è la qualità dell'antisiero che deve avere un titolo minimo di 2000. Il saggio IF può essere usato come unico saggio di selezione preliminare, ma è opportuno abbinarlo ad un secondo saggio di diversa natura come la PCR o l'isolamento diretto dopo arricchimento in idoneo brodo di coltura.

Procedura di esecuzione.

Ci sono due modi di preparare vetrini e di eseguire il saggio: usare una diluizione standard dell'antisiero e tre diluizioni del concentrato finale (a) oppure usare una diluizione standard del concentrato finale e diverse diluizioni dell'antisiero (b).

Nel primo caso (a) preparare diluizioni decimali (1:10, 1:100, 1:1000) del concentrato finale in acqua distillata sterile e pipettare un volume standard (15-20 μ l per pozzetti di diametro 6-8 mm) della sospensione ottenuta su una fila di pozzetti. La seconda fila può essere usata o per un duplicato del campione o per un secondo campione. Nel secondo caso (b) si sceglie una diluizione standard del concentrato finale (1:10 quando è presente poco amido nel campione oppure 1:100 negli altri casi) che va pipettato su tutti i pozzetti. Come controllo positivo si usa un vetrino preparato con due diluizioni della coltura di riferimento (un ceppo di collezione appartenente alla biovar 2, razza 3) di 10^7 e 10^6 cellule per ml, la prima diluizione nella fila superiore e la seconda in quella inferiore. Si lasciano asciugare le goccioline e poi le cellule batteriche vanno fissate al vetrino passando lo stesso alcune volte dardo del Bunsen.

Diluire l'antisiero con il tampone PBS 0,01 M secondo le seguenti modalità: per l'alternativa (a) la diluizione è pari alla metà del titolo; per l'alternativa (b) preparare tre diluizioni pari al titolo, a $\frac{1}{2}$ titolo e a $\frac{1}{4}$ titolo. Coprire i due pozzetti di destra (in alto e in basso) con 20 μ l di PBS ciascuno, i successivi due pozzetti con 20 μ l di una diluizione di antisiero preimmune 1:500 e gli ultimi sei con 20 μ l dell'antisiero anti-*R. solanacearum*. Incubare i vetrini per 30 minuti a temperatura di laboratorio, poi versare via l'antisiero ruotando il vetrino sul lato minore, lavare abbondantemente con PBS ed infine asciugare con carta bibula. Coprire i pozzetti con 20 μ l di IgG anti-coniglio coniugate con isotiocianato di fluoresceina alla diluizione consigliata dal produttore ed incubare di nuovo per 30 minuti a temperatura ambiente. Lavare i vetrini come già indicato ed asciugarli con carta bibula.

Osservazione dei vetrini

L'esame dei vetrini viene fatto con un microscopio ad epifluorescenza dotato di filtri idonei all'eccitazione della fluoresceina, in immersione e a 400-1000 ingrandimenti.

Preparare una soluzione con glicerolo e tampone carbonato a pH 9 (9:1, vv) e porne una goccia sui pozzetti da osservare. Verificare la presenza di cellule fluorescenti brillanti con morfologia caratteristica di *R. solanacearum* nei pozzetti di saggio: l'intensità della fluorescenza deve essere equivalente al ceppo di controllo positivo con la stessa diluizione dell'antisiero.

Interpretazione della colorazione IF

Per ciascun campione in cui non vengono trovate cellule fluorescenti brillanti con morfologia caratteristica il saggio IF è negativo.

Per ciascun campione in cui vengono trovate cellule fluorescenti brillanti con morfologia caratteristica, determinarne il numero medio per campo ottico e calcolarne il numero (N) rapportato ad un ml di concentrato finale:

per i campioni con $N > 10^3$, il saggio IF è positivo;

per i campioni con $N < 10^3$, il saggio IF può essere considerato positivo;

per i campioni con $N > 10^3$ aventi debole fluorescenza effettuare un secondo saggio basato su un diverso riconoscimento molecolare o ripetere la colorazione IF con un altro antisiero o una diluizione ulteriore del concentrato finale.

Reazione a catena della DNA polimerasi (PCR)

Il saggio PCR ha un'elevata sensibilità ma, a volte, è possibile ottenere delle false risposte negative quando nel campione sono presenti particolari sostanze di origine vegetale inibitrici l'attività polimerasica. In tutte le fasi di preparazione del campione e del saggio è indispensabile prestare particolare attenzione per evitare contaminazioni che porterebbero inevitabilmente ad ottenere delle false risposte positive. La soglia di sensibilità è attorno a 10^2 - 10^3 cellule per ml di concentrato finale estratto da patata. I primer consigliati dalla vigente normativa sono: OLI-1 (5'-GGG GGT AGC TTG CTA CCT GCC-3') e Y-2 (CCC ACT GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3') (Seal *et al.*, 1993). Si consiglia vivamente di usare questo saggio parallelamente a quello di immunofluorescenza in fase di selezione preliminare.

Procedura per il saggio

Preparare una sospensione in acqua distillata sterile di 10^6 cellule per ml da un ceppo di *R. solanacearum* di razza 3, biovar 2. Trasferire 90 μ l di concentrato finale per ogni campione e della sua diluizione 1:10 ed altrettanti μ l della coltura di controllo in altrettante microprovette ed aggiungere a ciascuna 10 μ l di NaOH 0.5M. Agitare e riscaldare a 100 °C per 4 minuti e, poi, trasferirle immediatamente in ghiaccio.

Preparare in condizioni di estrema pulizia e mantenendo i reagenti in ghiaccio la miscela di reazione trasferendo in una provettina sterile monouso i seguenti reagenti nel seguente ordine:

Componente	Quantità per reazione	Concentrazione finale
Acqua bidistillata sterile	33,8 μ l	
10x tampone PCR	5,0 μ l	1x
d-ATP	1,0 μ l	0,2 mM
d-CTP	1,0 μ l	0,2 mM
d-GTP	1,0 μ l	0,2 mM
d-TTP	1,0 μ l	0,2 mM
Primer OLI-1 (20 μ M)	2,5 μ l	1,0 μ M
Primer Y-2 (20 μ M)	2,5 μ l	1,0 μ M
Taq polimerasi (5U/ μ l)	0,2 μ l	1,0 U
Volume totale	48 μ l	

Trasferire 48 μ l della miscela in provettine da PCR ed aggiungere 2 μ l di campione. Preparare anche un controllo negativo utilizzando 2 μ l di acqua distillata come campione.

Reazione di amplificazione

Porre le provettine nel blocco di riscaldamento del termociclatore, chiudere ed impostare il seguente programma:

- 1 ciclo di:
 - 2 minuti a 96°C per la denaturazione del target
- 35 cicli di:
 - 20 secondi a 94°C per la denaturazione dello stampo
 - 20 secondi a 68°C per l'appaiamento dei primer
 - 30 secondi a 72°C per l'allungamento della copia
- 1 ciclo di:
 - 10 minuti a 72°C per un ulteriore allungamento della copia.

Togliere le provettine dal termociclatore e metterle in ghiaccio se l'analisi degli amplificati viene fatta lo stesso giorno, altrimenti mantenerle a -20°C.

Analisi degli amplificati

Preparare un gel di agarosio al 2% in tampone TAE, con un numero di pozzetti adeguato al numero di campioni da analizzare, più i controlli positivo e negativo ed almeno un ulteriore pozzetto per il marcatore di peso molecolare. Inserire il gel in un'appropriata cella elettroforetica. Su un frammento di parafilm mettere diverse goccioline da 2 μ l di tampone di caricamento e, di volta in volta, aggiungere a queste goccioline 12 μ l di amplificato aspirando delicatamente il tutto per una miscelazione ottimale prima di caricare accuratamente la miscela ottenuta nel proprio pozzetto. Ripetere l'operazione per ogni campione, inclusi i controlli. Nel primo e nell'ultimo pozzetto mettere 4 μ l di marcatore di peso molecolare (100 bp DNA Ladder). Attivare la gel-elettroforesi a 5-8 V/cm fino a quando il fronte dell'indicatore della corrente superficiale si trovi a circa 1 cm dalla fine del gel. Spegner la cella elettroforetica, estrarre il gel e porlo in una soluzione di bromuro di etidio per 30 minuti, risciacquare in acqua distillata ed osservare su un transilluminatore UV. La presenza di una singola banda luminosa di 288 bp conferma la presenza di *R. solanacearum* nel campione.

Isolamento selettivo in piastra

Preparare almeno due diluizioni decimali del concentrato finale, per esempio 1:10 e 1:100. Trasferire 50 μ l di ogni diluizione su substrato selettivo SMSA e distribuirlo sull'intera superficie del substrato. Con la stessa tecnica inseminare una sospensione di 10⁶ cellule per ml di un ceppo della razza 3, biovar 2 di *R. solanacearum*. Tenere in incubazione le piastre a 28°C e leggerle a partire da 3 giorni dall'inseminazione fino ad un massimo di 6 giorni. Purificare le colonie a morfologia caratteristica con subcoltura su un substrato nutritivo generale.

Identificare le colture pure così ottenute con una prova di patogenicità.

Prove di arricchimento

Trasferire 100 μ l di concentrato finale in 3-5 ml di brodo SMS in provette con il tappo non completamente avvitato, per favorire l'aerazione e porre in incubazione a 28°C per 48-72 ore. Avvitare perfettamente il tappo ed agitare sul vortex. Prelevare aliquote della sospensione per

effettuare i saggi preliminari (IF, PCR e/o altri) come già descritto. Dopo l'arricchimento è anche possibile tentare l'isolamento diretto, dopo aver effettuato una o più diluizioni decimali della sospensione, ed usando 50 μ l di ogni singola diluizione per l'inseminazione sul substrato SMSA.

Saggio biologico

Usare 10 plantule di pomodoro allo stadio di 3 foglie vere allevate in altrettante buchette di contenitori di polisterolo. Con bisturi sterile effettuare un taglio lungo circa 0,5 cm alla base dei fusti e, tenendo leggermente divaricati i bordi, applicare nella ferita 10 μ l di concentrato finale usando una microsiringa. L'inoculazione può essere fatta anche iniettando con ago di siringa il concentrato finale direttamente nel fusto. Tenere in osservazione le plantule in ambiente a 28–30°C, illuminato, con innaffiature giornaliere. Entro 5-7 giorni, in presenza di *R. solanacearum*, le plantule manifesteranno dapprima perdita di turgore di fogliole, poi di intere foglie ed infine collasso totale. La frequenza di plantule sintomatiche dipende dalla concentrazione di *R. solanacearum* nel concentrato finale. Da una plantula sintomatica asportare un segmento di 1 cm di fusto a 2 cm sopra il punto di inoculazione. Renderlo poltiglia in poca acqua distillata sterile. Usare la sospensione per l'isolamento diretto. In caso di comparsa di colonie a morfologia tipica, purificarle e identificarle.

Prova di patogenicità

Si usano plantule di pomodoro applicando lo stesso metodo descritto per il saggio biologico; in tal caso l'inoculazione è fatta con una sospensione di concentrazione 10^6 cellule per ml della coltura pura da identificare.

LAVORI CITATI

- ELPHINSTONE J.G., HENNESSY J., WILSON J., STEAD D.E., 1996. Sensitivity of different methods for the detection of *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith in potato tuber extracts. EPPO Bulletin, 26.
- KELMAN A., 1954. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. Phytopathology, 64, 293-295.
- OEPP/EPPO, 1990. Quarantine procedure N°26. *Pseudomonas solanacearum* EPPO Bulletin 20, 255-262
- SEAL S.E., JACKSON L.A., YOUNG J.P.W., DANIELS M.J., 1993. Detection of *Pseudomonas solanacearum*, *Pseudomonas syzygii* *Pseudomonas pickettii* and Blood Disease Bacterium by partial 16S rRNA sequencing: construction of oligonucleotide primers for sensitive detection by polymerase chain reaction. Journal of General Microbiology, 139, 1587-1594.