

Consiglio Nazionale delle Ricerche – Mobilità di breve durata

RELAZIONE FINALE

Fruitore: Dott. Andrea Uccello - Università degli Studi di Firenze, Dipartimento di Biotecnologie Agrarie, Sezione di Difesa delle Piante – P.le delle Cascine, 28 – 50144 Firenze

Proponente: Prof. Alessandro Ragazzi - Università degli Studi di Firenze, Dipartimento di Biotecnologie Agrarie, Sezione di Difesa delle Piante – P.le delle Cascine, 28 – 50144 Firenze

Titolo: “ITS-RFLP: possibili applicazioni nello studio delle *Botryosphaeriaceae*”.

La famiglia delle *Botryosphaeriaceae* comprende più di 1500 specie, suddivise in 26 generi (Kirk *et al.*, 2008), per lo più costituite da specie saprofiti ed endofite; fra queste ultime, ve ne è un certo numero, da tempo noto su piante legnose di interesse agrario, che negli ultimi anni ha mostrato delle potenziali capacità patogenetiche su piante forestali, specie quando queste ultime sono sottoposte a stress ambientali, principalmente di natura idrica e termica (Slippers *et Wingfield*, 2007).

Lo studio di questi microrganismi ha incontrato, quale limite principale, la corretta identificazione degli isolati: l’osservazione delle strutture riproduttive è possibile solo coltutando gli isolati su substrati *ad hoc*, in quanto su substrati comuni (PDA o MEA, ad esempio), la sporulazione delle *Botryosphaeriaceae* è un evento raro e del tutto casuale; l’identificazione, inoltre, è ulteriormente complicata dalla variabilità morfologica in seno ai due morfotipi principali (“*Diplodia* like”, dai conidi di forma tendenzialmente ellittica, ialini o pigmentati, non o mono settati, e “*Fusicoccum* like”, sempre ialini e di forma fusoidi-allungata), all’interno dei quali esistono aree di sovrapposizione fra i valori delle dimensioni delle strutture osservate, fattore che esclude l’oggettività della diagnosi. Un notevole incremento nella conoscenza di questi microrganismi è stato dato dall’adozione di tecniche di biologia molecolare legate all’uso della PCR, innovazione che ha comportato la completa riscrittura della tassonomia di questa famiglia di ascomiceti (Crous *et al.*, 2006; Phillips *et al.*, 2008); la progressione degli studi in questo settore, ha permesso l’individuazione di nuove specie, spesso non distinguibili su basi morfologiche, e l’emersione di complessi aventi all’interno due o più specie “criptiche”; questi ultimi, per poter essere compresi, richiedono analisi multi geniche, che permettano il confronto di più sequenze dello stesso microrganismo con quelle presenti nei database (Slippers *et al.*, 2004; Burgess *et al.*, 2006; Alves *et al.*, 2008). L’inconveniente principale di questo tipo di tecnica è il fatto che richieda l’amplificazione e il sequenziamento di più regioni di DNA, fattore che incide in maniera notevole sia sui costi che sui tempi della diagnosi; un ulteriore problema è la messa a punto di protocolli di amplificazione differenti per ciascuna delle regioni *target*, problema che non riguarda solo l’impostazione dei cicli nella reazione di PCR ma anche nella scelta dei reagenti, polimerasi *in primis*, oltre alla disponibilità nei database di sequenze delle regioni che si è scelto di amplificare. Tecniche di *fingerprinting* offrono risultanze dai profili complessi, molto utili in caso di studi di popolazione ma di difficile uso diagnostico. Ottenere dei profili che presentino poche bande, di dimensioni caratteristiche e specie-specifiche, sarebbe una possibile soluzione per poter procedere con identificazioni celeri e, possibilmente, a basso costo e tecnicamente poco problematiche.

Con lo scopo di mettere a punto un protocollo diagnostico con le caratteristiche suddette, il sottoscritto fruitore ha svolto uno stage presso il FABI (Forest and Agriculture Biotechnology Institute) dell'Università di Pretoria, Sud Africa, dal 15/10/2009 al 15/04/2010.

MATERIALI E METODI

L'esigenza di mettere a punto un protocollo di semplice utilizzo, economico e che fornisse profili semplici, ma utili nella diagnosi, ha portato a scegliere di utilizzare la tecnica di RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) su campioni di cui previamente era stata amplificata la regione ITS.

La scelta della regione da digerire enzimaticamente è ricaduta sull'ITS (servendosi dei primer ITS1 e ITS4, Tab.1) perché vi sono disponibili diversi protocolli di amplificazione di comprovata efficacia, perché vasto è l'archivio di sequenze nei database per questa regione e perché, essendo le sequenze di questa non sempre sufficienti a dirimere i dubbi legati ai complessi di specie criptiche, si è voluto valutarne i risultati ottenibili utilizzando un altro tipo di approccio.

Il prodotto di amplificazione di 41 isolati, afferenti a diverse specie e di diversa provenienza geografica (Tab. 2), è stato purificato e digerito utilizzando una coppia di enzimi di restrizione, EcoRI e MseI, per 3 ore a 37°C, con successiva inattivazione degli enzimi a 65°C per 15 minuti. Il DNA digerito è stato successivamente fatto correre per 60 minuti su gel di agarosio alla concentrazione del 2,5%. Le foto dei gel sono state acquisite elettronicamente e successivamente elaborate con un software per il fotoritocco per consentire, sfruttando il profilo del ladder per il corretto allineamento, il confronto fra isolati di specie affini, anche quando caricati in pozzetti lontani o in gel diversi.

RISULTATI

I profili ottenuti, per tutti gli isolati testati, presentano 2 o 3 bande, rispondendo al requisito di semplicità nella lettura che un buon metodo diagnostico deve avere.

Gli isolati di *Botryosphaeria dothidea* hanno mostrato un profilo uniforme, con lievi differenze nelle dimensioni dei frammenti digeriti enzimaticamente, fatto spiegabile con l'eterogenea provenienza geografica degli stessi; gli unici due profili che si distinguono nettamente (CMW25692 e BOT36) appartengono a isolati reperiti su ospiti legnosi non arborei (Fig. 1). Pur essendo esiguo il numero di campioni, le differenze nei profili fra isolati da piante arboree e non offre lo spunto per un approfondimento volto a capire se, all'interno della specie, vi si possano essere evoluti dei gruppi che preferenzialmente infettano piante di grosse dimensioni ed altri la cui preferenza è rivolta verso piante di grandezza più contenuta.

Il genere *Diplodia*, presente in collezione con 16 isolati appartenenti a quattro specie diverse, ha fornito profili in grado di discriminare facilmente una specie dall'altra (Fig. 2).

I tre isolati di *Dothiorella sarmentorum* sono stati facilmente distinguibili dall'isolato di *Dothiorella iberica*; gli isolati BA4 e BA11, inoltre, provengono dagli stessi tessuti dello stesso ospite, pur mostrando chiaramente come siano individui differenti (Fig. 3).

Gli isolati di *Neofusicoccum parvum* hanno mostrato dei profili influenzati dalla provenienza geografica: da BOT21, BOT22, BA18 e BA24, tutti provenienti dalla Toscana, si sono ottenuti profili molto simili, a differenza di BA20 ed F49, rispettivamente isolati in Lombardia e in Sardegna, i cui profili ottenuti sono diversi fra loro e diversi dagli isolati toscani (Fig. 4).

CONCLUSIONI

Dalle indicazioni tratte, l'uso della tecnica testata lascia intuire delle potenzialità nell'applicazione diagnostica, potenzialità che andranno valutate in maniera più accurata, testando un numero maggiore di isolati e di specie e testando ulteriori enzimi di restrizione.

Da tale prova, infatti, oltre alle considerazioni già esposte, si evince come la coppia di enzimi utilizzata fornisca profili praticamente identici per gli isolati di *Botryosphaeria dothidea* (con le eccezioni sopra descritte), *Diplodia corticola* e *Dothiorella sarmentorum*.

Inoltre, essendo una prova pilota, il numero degli isolati testati risulta essere esiguo per fornire risultati affidabili in campo diagnostico.

Aumentando lo spettro delle specie, ciascuna rappresentata da un numero congruo di isolati di diversa origine geografica, e testando un più elevato numero di enzimi di restrizione (e loro combinazioni), si potrebbe ovviare agli inconvenienti sopra descritti e giungere ad un database di profili caratteristici, che possano portare velocemente ad una diagnosi attendibile ed economica.

BIBLIOGRAFIA

- Alves A., Crous P.W., Correia A., Phillips A.J.L., 2008. Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*. *Fungal Diversity* **28**: 1-13
- Burgess T.I., Barber P.A., Mohali S., Pegg G., de Beer W., Wingfield M.J., 2006. Three new *Lasiodiplodia* spp. From the tropics, recognized based on DNA sequence comparisons and morphology. *Mycologia* **98** (3): 423-435.
- Crous P.W., Slippers B., Wingfield M.J., Rheeder J., Marasas W.F.O., Phillips A.J.L., Alves A., Burgess T., Barber P., Groenwald J.Z., 2006. Phylogenetic lineages in the *Botryosphaeriaceae*. *Studies in Mycology* **55**: 235-253.
- Kirk P.M., Cannon P.F., Minter D.W., Stalpers J.A., 2008. *Ainsworth and Bisby's dictionary of the Fungi*, 10th ed. CAB International, 2283pp. Wallingford, U.K.
- Phillips A.J.L., Alves A., Pennycook S.R., Johnston P.R., Ramaley A., Akulov A., Crous P.W., 2008. Resolving the phylogenetic and taxonomic status of dark-spored teleomorph genera in the *Botryosphaeriaceae*. *Persoonia* **21**: 29-55.
- Slippers B., Crous P.W., Denman S., Coutinho T.A., Wingfield B.D., Wingfield M.J., 2004. Combined multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several species previously identified as *Botryosphaeria dothidea*. *Mycologia* **96** (1): 83-101
- Slippers B., Wingfield M.J., 2007. *Botryosphaeriaceae* as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. *Fungal Biology Reviews* **21**: 90-106.
- White T. J., Bruns T., Lee S., Taylor J. W., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, eds. Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White. Academic Press, Inc., New York. Pp. 315-322

APPENDICE

Tab. 1 – Primer utilizzati nelle prove

Nome primer	Sequenza	Riferimento
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	White <i>et al.</i> , 1990
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	White <i>et al.</i> , 1990

Tab. 2 – Lista isolati testati

Specie	Isolato	Ospite	Origine	Fornitore
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	B7	<i>Acer pseudoplatanus</i>	Milano Italia	Andrea Uccello
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	BA23	<i>Crataegus monogyna</i>	Milano Italia	Andrea Uccello
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	BA25a	<i>Acer pseudoplatanus</i>	Pistoia Italia	Andrea Uccello
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	BA25b	<i>Acer pseudoplatanus</i>	Pistoia Italia	Andrea Uccello
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	BA5	<i>Acer platanoides</i>	Milano Italia	Andrea Uccello
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	BOT36	<i>Vitis vinifera</i>	San Casciano (SI) Italia	Alessandro Spagnolo
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	CMW 25692	<i>Cotinus coggygria</i>	Slovenia Gorjansko	Dusan Jurc
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	CMW 26224	<i>Ostrya carpinifolia</i>	Slovenia Stolovec	Dusan Jurc
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	KT129	<i>Acacia cochlearis</i>	Southern Western Australia	Treena Burgess
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	KT209	<i>Acacia rostellifera</i>	Southern Western Australia	Treena Burgess
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	KT86	<i>Acacia rostellifera</i>	Southern Western Australia	Treena Burgess
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	QLD30	<i>Eucalyptus dunnii</i>	Southern Queensland Australia	Treena Burgess
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	QLD35	<i>Eucalyptus grandis</i>	Southern Queensland Australia	Treena Burgess
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	QLD39	<i>Eucalyptus dunnii</i>	Southern Queensland Australia	Treena Burgess
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	SL 353	<i>Vitis vinifera</i>	Spagna	Alessandro

				Spagnolo
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	WA7	<i>Corymbia callophylla</i>	Southern Western Australia	Treena Burgess
<i>Diplodia corticola</i>	Bari 72	<i>Quercus pubescens</i>	Bari Italia	Nicola Luisi
<i>Diplodia corticola</i>	Bari 73	<i>Quercus pubescens</i>	Bari Italia	Nicola Luisi
<i>Diplodia corticola</i>	Bari 79	<i>Quercus cerris</i>	Bari Italia	Nicola Luisi
<i>Diplodia corticola</i>	Bari 81	<i>Quercus cerris</i>	Bari Italia	Nicola Luisi
<i>Diplodia mutila</i>	BA12	<i>Alnus cordata</i>	Milano Italia	Andrea Uccello
<i>Diplodia mutila</i>	BA14	<i>Alnus cordata</i>	Milano Italia	Andrea Uccello
<i>Diplodia pinea</i>	BA1	<i>Sorbus torminalis</i>	Monticiano (SI) Italia	Andrea Uccello
<i>Diplodia seriata</i>	BA13	<i>Quercus rubra</i>	Milano Italia	Andrea Uccello
<i>Diplodia seriata</i>	BA15	<i>Acer platanoides</i>	Milano Italia	Andrea Uccello
<i>Diplodia seriata</i>	BA16	<i>Quercus rubra</i>	Milano Italia	Andrea Uccello
<i>Diplodia seriata</i>	BA19	<i>Prunus avium</i>	Pistoia Italia	Andrea Uccello
<i>Diplodia seriata</i>	BA22	<i>Carpinus betulus</i>	Milano Italia	Andrea Uccello
<i>Diplodia seriata</i>	BA3	<i>Acer platanoides</i>	Milano Italia	Andrea Uccello
<i>Diplodia seriata</i>	BA6	<i>Quercus rubra</i>	Milano Italia	Andrea Uccello
<i>Diplodia seriata</i>	BA7	<i>Acer platanoides</i>	Milano Italia	Andrea Uccello
<i>Diplodia seriata</i>	BA8	<i>Quercus rubra</i>	Milano Italia	Andrea Uccello
<i>Diplodia seriata</i>	BA9	<i>Acer platanoides</i>	Milano Italia	Andrea Uccello
<i>Dothiorella iberica</i>	DI50	<i>Quercus suber</i>	Sardegna Italia	Antonio Franceschini
<i>Dothiorella sarmentorum</i>	BA10	<i>Acer platanoides</i>	Milano Italia	Andrea Uccello
<i>Dothiorella sarmentorum</i>	BA11	<i>Acer platanoides</i>	Milano Italia	Andrea Uccello (probabilmente è lo stesso)

				isolato)
<i>Dothiorella sarmentorum</i>	BA4	<i>Acer platanoides</i>	Milano Italia	Andrea Uccello
<i>Neofusicoccum parvum</i>	BA18	<i>Vitis vinifera</i>	San Casciano (SI) Italia	Alessandro Spagnolo
<i>Neofusicoccum parvum</i>	BA20	<i>Quercus robur</i>	Milano Italia	Andrea Uccello
<i>Neofusicoccum parvum</i>	BA24	<i>Quercus rubra</i>	Pistoia - CESPEVI	Andrea Uccello
<i>Neofusicoccum parvum</i>	BOT21	<i>Vitis vinifera</i>	San Casciano (SI) Italia	Alessandro Spagnolo
<i>Neofusicoccum parvum</i>	BOT22	<i>Vitis vinifera</i>	San Casciano (SI) Italia	Alessandro Spagnolo
<i>Neofusicoccum parvum</i>	F49	<i>Quercus suber</i>	Sardegna	Antonio Franceschini

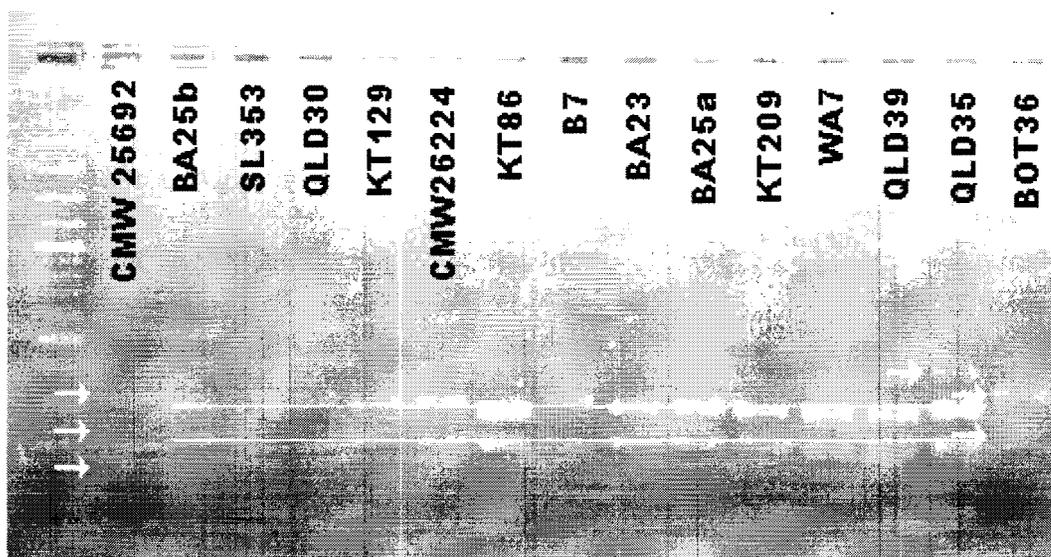


Fig. 1

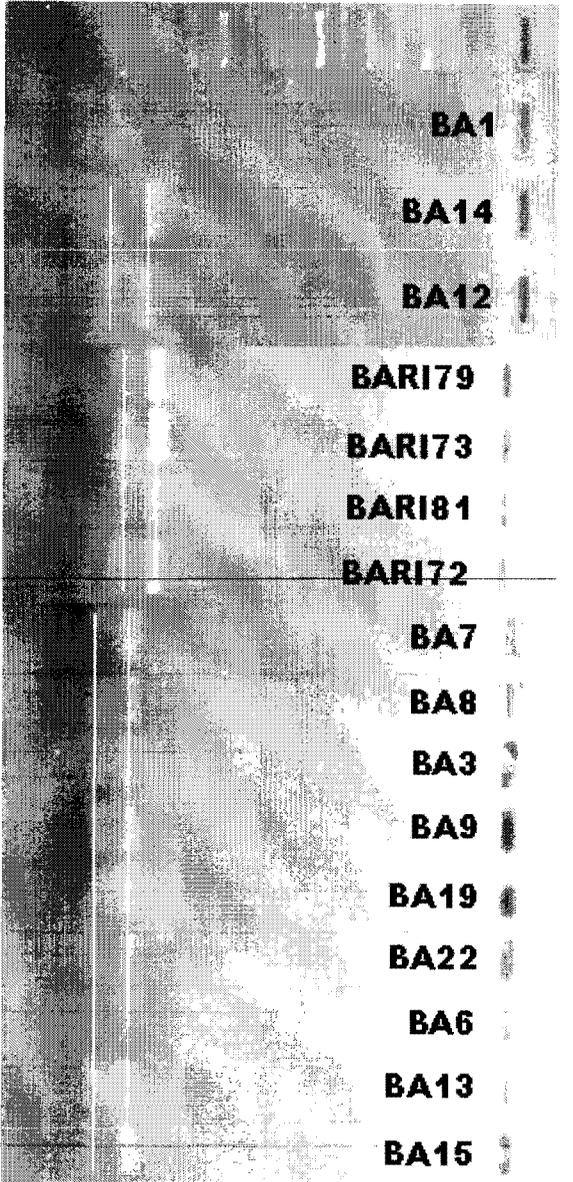


Fig. 2

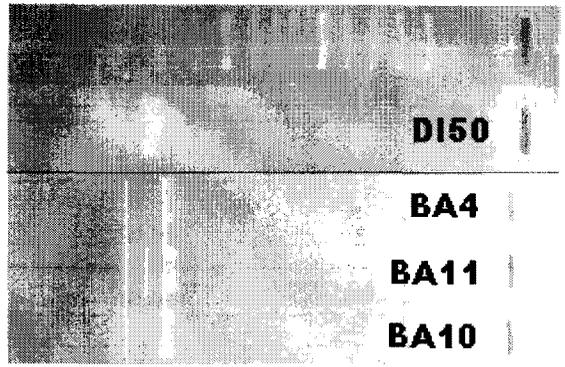


Fig. 3

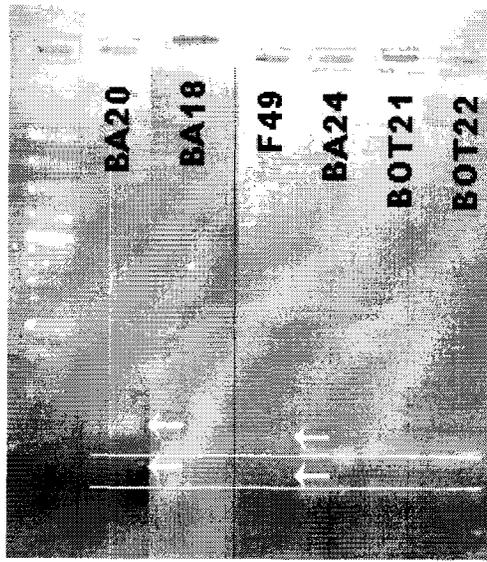


Fig. 4