



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI CATANIA  
FACOLTA' DI SCIENZE MATEMATICHE, FISICHE E NATURALI  
DIPARTIMENTO DI SCIENZE BIOLOGICHE, GEOLOGICHE E AMBIENTALI

---

DOTTORATO DI RICERCA IN  
BIOLOGIA ED ECOLOGIA VEGETALE IN AMBIENTE MEDITERRANEO  
XXIV CICLO, 2008-2011

ROSA ELENA SPALLINO

**Teratologia vs Patologia vegetale,  
associazione di fitoplasmi a modificazioni di forma  
in piante spontanee e coltivate**

---

*DISSERTAZIONE FINALE*

---

COORDINATORE

Prof. Giuseppe Maugeri

TUTOR

Dott.ssa Matilde Tessitori

---

## INDICE

INTRODUZIONE.....	1
1. ORIGINE DEL CONCETTO DI TERATOLOGIA .....	1
2. LE MALFORMAZIONI NELL'ICONOGRAFIA BOTANICA .....	8
3. MANUALI SULLE TERATOLOGIE IN BOTANICA .....	14
4. DALLA TERATOLOGIA AL CONCETTO DI MALATTIA .....	16
5. TERATOLOGIA VS SEMEIOTICA E ANATOMIA PATOLOGICA .....	20
6. CLASSIFICAZIONE GENERALE DEI PROCARIOTI PATOGENI DELLE PIANTE.....	23
7. CARATTERISTICHE GENERALI DEI BATTERI FITOPATOGENI.....	25
7.1 Patogenesi .....	26
7.2 Epidemiologia .....	27
7.3 <i>Rhodococcus fascians</i> (Tilford) Goodfellow .....	29
7.3.1 <i>Sintomatologia</i> .....	29
7.3.2 <i>Patogenesi</i> .....	30
7.3.3 <i>Diagnosi e rilevamento del patogeno</i> .....	32
8. I FITOPLASMI .....	33
8.1 Caratteristiche generali.....	34
8.2 Classificazione dei fitoplasmi .....	36
8.3 Sintomatologia .....	40
8.4 Epidemiologia .....	41
8.5 Patogenesi .....	43
8.5.1 <i>Possibili fattori coinvolti nello sviluppo della malattia</i> .....	44
8.5.2 <i>Il gene TENGU</i> .....	47
SCOPO DEL LAVORO .....	49
MATERIALI E METODI.....	52
1. MATERIALE VEGETALE .....	52
2. IDENTIFICAZIONE DI ISOLATI BATTERICI.....	55
2.1 Isolamento e morfologia delle colonie .....	55
2.1. Diagnosi dei batteri tramite PCR con primer universali .....	56
2.2. Sequenziamento del 16S rRNA batterico .....	57

---

---

2.3. Primer specie-specifici per l'identificazione di <i>Rhodococcus fascians</i> .....	57
2.4. Profilo metabolico e identificazione automatizzata .....	58
3. CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI FITOPLASMI.....	59
3.1 Estrazione di acidi nucleici totali .....	59
3.1.1 Protocollo Proteinasi K .....	59
3.1.2 Protocollo CTAB ( <i>Cetyl methyl ammonium bromide</i> ).....	60
3.2 Diagnosi dei fitoplasmi tramite nested-PCR con primer universali .....	61
3.3 Primer gruppo specifici per il riconoscimento di fitoplasmi noti .....	63
3.4 Purificazione del DNA dopo reazioni di PCR .....	63
3.5 Reazione di ligazione in vettore plasmidico e clonaggio.....	64
3.6 Isolamento del DNA plasmidico.....	66
3.7 Sequenziamento del 16S rRNA fitoplasmale.....	67
3.8 Analisi bioinformatica dei dati di sequenza .....	67
3.9 RFLP virtuali.....	68
4. RICERCA DEL GENE DI PATOGENICITÀ TENGU.....	72
4.1 Primer specifici per il rilevamento del gene TENGU .....	72
4.2 Clonaggio e sequenziamento.....	73
RISULTATI .....	74
1. MATERIALE VEGETALE .....	74
2. IDENTIFICAZIONE DEGLI ISOLATI BATTERICI .....	80
2.1 Isolamento e morfologia delle colonie.....	80
2.2 Diagnosi dei batteri tramite PCR con primer universali .....	81
2.3 Sequenziamento del 16S rRNA batterico .....	82
2.4 Primer specie-specifici per l'identificazione di <i>Rhodococcus fascians</i> .....	82
2.5 Profilo metabolico e identificazione automatizzata .....	82
3. CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI FITOPLASMI.....	83
3.1 Estrazione degli acidi nucleici totali .....	83
3.2 Diagnosi dei fitoplasmi tramite nested-PCR con primer universali .....	83
3.3 Primer gruppo specifici per il riconoscimento di fitoplasmi noti .....	84
3.4 Purificazione del DNA dopo reazioni di PCR .....	87
3.5 Reazione di ligazione in vettore plasmidico e clonaggio.....	87

---

3.6 Isolamento del DNA plasmidico.....	88
3.7 Sequenziamento del 16S rRNA fitoplasmale.....	88
3.8 Analisi bioinformatica dei dati di sequenza.....	89
3.9 RFLP virtuali.....	92
4. RICERCA DEL GENE DI PATOGENICITÀ TENGU.....	100
4.1 Primer specifici per il rilevamento del gene TENGU.....	100
4.2 Clonaggio e sequenziamento.....	101
DISCUSSIONI.....	102
LETTERATURA CITATA.....	110
Allegato I - SCHEDE TERATOLOGICHE IMPLEMENTATE.....	116
Allegato II - ALLINEAMENTI.....	171

---

## INTRODUZIONE

### 1. ORIGINE DEL CONCETTO DI TERATOLOGIA

Da oltre duemila anni il “mostruoso” entra nella dialettica continua tra processo normale e patologico, tra risultato accettabile e malato.

Il significato della parola 'mostro' ha subito drastiche variazioni nel corso della storia.

In greco "mostro" è *téras*, termine di origine oscura, che indica prima il segno divino, inviato in particolare da Zeus e che spesso implica un'atmosfera di terrore (Fortunati, 1995), mentre da Omero in poi la parola *téras* si applica a qualsiasi segno divino che i mortali possono interpretare per prevedere il futuro.

Il latino *monstrum* equivale solo in parte al greco *téras*. Questa parola deriva da *monere*, ammonire, e da *monstrum* deriva *monstrare*, mostrare, nel senso di un'indicazione che gli dei danno e che i mortali devono interpretare. Il *monstrum* è dunque un essere vivente fuori dal naturale, appunto ‘mostruoso’ ed assume il significato di un avvertimento divino, di un presagio che prende l'aspetto di un essere sovranaturale. Il termine *monstrum* viene esteso a tutto ciò che è spaventoso e orribile, in seguito lo si usa con un significato più restrittivo per indicare ogni nascita straordinaria, ogni produzione ritenuta irregolare, ogni fenomeno insolito.

Da *téras* e *-logia*, discorso, studio, è derivato il termine "teratologia", che in zoologia così come in botanica indica lo studio delle mostruosità o anomalie morfologiche (Battisti e Alessio, 1975). I 'mostri' del mondo classico sono stati dei segni, non necessariamente di origine umana o animale, che erano chiaramente identificabili come tali.

La *teratologia* si configura perciò come campo di osservazione di questi segni, interpretati molto spesso come divinazioni. Si deve sottolineare che fu proprio a causa della loro inusualità che i mostri vennero definiti come avvertimenti chiari e distinguibili del fato avverso, della divinità malevola o incollerita o come risultato di pratiche malvagie. Il significato traslato di “essere mostruoso” è attestato in Plauto e in Terenzio, ma prima ancora in Lucrezio, che definisce “*monstra ac portenta*” gli androgeni e gli esseri deformati, e in Catullo. Nella storia della parola “mostro”,

permane perciò il significato di essere anormale, contrario alle leggi della natura (Fortunati, 1995).

Cicerone nel “*De divinazione*” ricorda che *monstra, ostenta, portenta, prodigia appellantur quoniam monstrant, ostendunt, portendunt et praedicunt*, vale a dire

«vengono chiamati mostri, apparizioni miracolose, portenti e prodigi quelle cose che mostrano, fanno vedere, pronosticano, predicano» sottolineando il carattere predittivo del mostro come segno che informa l'uomo della volontà divina.

I medici, formati in filosofia naturale, sono stati i principali promotori e cronisti di meraviglie e mostruosità del genere umano. Nel mondo classico, numerose sono le descrizioni minuziose ed i ritratti medici di teratologie, prive però di alcuna verità scientifica.

Studiosi, pensatori e artisti di tutti i tempi hanno monitorato e rappresentato le apparizioni di esseri mostruosi. I mostri li troviamo già nelle pitture rupestri; nel poema epico assiro-babilonese, i combattimenti di Gilgamesh contro di loro si ritrova scritto in caratteri cuneiformi su tavolette d'argilla nel III-II millennio a.C.

Li ritroviamo nella mitologia greca, piena di eroi e di dei che lottano contro i mostri: Ermes uccide Argo, gigante dai cento occhi; Teseo uccide il Minotauro, per metà uomo e per metà toro; a cavallo di Pegaso, Bellerofonte uccide la Chimera, leone nella parte anteriore, capra nella parte mediana e drago nella parte posteriore; Ulisse si scontra con i Ciclopi e poi incontra le Sirene; Perseo uccide Medusa, che ha serpenti al posto dei capelli, ecc. Nella mitologia greca troviamo più di un centinaio di mostri e, di questi, alcuni appaiono nei testi medievali, come ad esempio i Centauri, per metà uomini e per metà cavalli, la chimera e le sirene.

Tra i vari autori latini importanti nella trasmissione delle tradizioni greche all'Occidente medievale ricordiamo, ad esempio, il geografo latino Pomponio Mela che, nella sua "*Chorographia*" (37-41 d.C.), parla degli Acefali, dei Macrocefali, del vampirismo e della licantropia.

Gli stessi miti vengono prima ripresi dai Romani e infine trasmessi al Medioevo. Le principali testimonianze sui mostri nate nell'antichità pagana passano al vaglio di sant'Agostino, che, per quanto riguarda i mostri è il cardine fra età antica e Medioevo, fra cultura pagana e cultura cristiana (Kappler, 1983). Egli fu il primo a porsi la domanda sulla creazione dei mostri, se esistono, è perché è stato voluto da Dio per delle ragioni che possono anche rimanere sconosciute, ma che non alterano in alcun modo l'armonia del Creato. I mostri, quindi, non sono frutto del caso o di carenze genetiche, come sosteneva Aristotele, ma rientrano nell'ordine voluto da Dio, fanno parte dell'ampio dominio dei *miracula* ed ammette l'esistenza e persino conferisce loro una sorta di legalità.

Il Medioevo non inventa ma riproduce, interpreta, amplifica e contamina, e dalla fine dell'Antichità è difficilissimo incontrare *mirabilia* del tutto nuovi. L'Occidente medievale conosce solo quelli creati dai Greci, anzi, come dice Orlandi nel 1983, ne conosce di meno, perché quelli che non furono tradotti in latino rimasero sconosciuti (Orlandi, 1983).

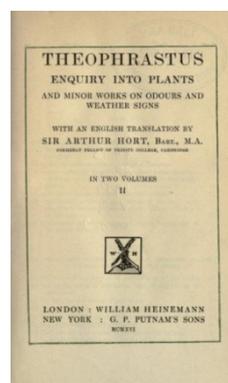
Durante il Medioevo, e non solo, sono i popoli mostruosi ad apparire frequentemente nell'arte, nella letteratura, nelle enciclopedie; molti di questi popoli considerati mostruosi nel Medioevo, in realtà non lo sono per niente, sono solo diversi nell'aspetto o nelle usanze da chi li descrive.

Anche nella Bibbia si trovano numerosi riferimenti a figure mostruose, sono metafore per rappresentare ogni genere di male, per intimorire e dissuadere dal peccato, altre volte sono diavoli, altre ancora incroci mostruosi e terribili. Tra i passi più celebri ci sono per esempio quelli dell'*Apocalisse*, come quello che narra la battaglia tra Michele e il drago; non mancano nell'arte, nei libri e nelle credenze orientali. Le razze mostruose pongono anche una serie di interrogativi ai Cristiani del Medioevo: ci si chiede se hanno un'anima, se sono dotati di ragione, se discendono da Adamo, come il resto dell'umanità, o da una linea diversa.

Verso il VI secolo, Isidoro di Siviglia tenta per primo di dare una definizione del termine *monstrum* che va oltre quella di "contro natura", ma il termine mantiene ancora il significato di "portento", ovvero segni che pronosticano e predicono il futuro. Diversi scrittori usano, invece, *monstrum* per indicare non solo le razze indiane e africane descritte dai primi viaggiatori greci, ma qualsiasi popolo che si discosti dalle norme culturali occidentali.

Anche le "mostruosità" connesse al mondo vegetale, hanno suscitato tra i botanici molta curiosità. Fiori doppi, anomalie fiorali e mutanti floreali sono quindi stati i primi riconoscimenti di esempi di anomalie su piante.

La prima citazione relativa a mostruosità nel mondo vegetale risale al 286 a.C. con il filosofo greco Teofrasto. Tra le sue opere rivestono grande importanza due ampi trattati botanici: "*Storia delle piante*" e "*Cause delle piante*": opere che costituiscono il contributo più importante allo studio della scienza botanica, non soltanto dell'antichità ma anche del Medioevo.

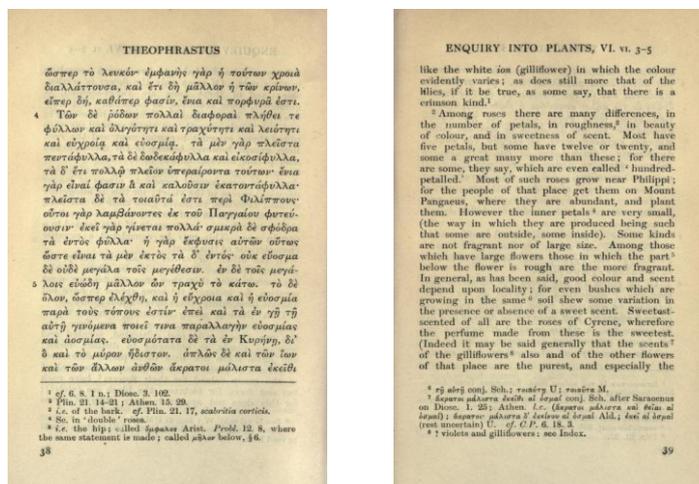


Teofrasto e frontespizio di una edizione del 1916 della *Cause delle piante*

In "*Storia delle Piante*", Teofrasto menziona teratologie riguardanti parti fiorali in *Rosa canina* L. rinvenute a Filippi e sul Monte Pangeus presso Anfipoli, antica città della Grecia. Il passo descrive fiori con un numero di petali superiore al normale (cinque), riportando la descrizione di fiori con 12, 20 e in alcuni casi anche 100 petali. In altre descrizioni riporta anomalie riguardanti la rugosità, le dimensioni e anche l'odore.

I contributi di Teofrasto sulle conoscenze riguardanti le cause delle malformazioni delle piante sono piuttosto limitate e legate alle convinzioni del suo

tempo. In molti dei primi riferimenti, le mostruosità venivano connesse a maledizioni o a punizioni della divinità verso il popolo macchiatosi di peccato. In assenza di spiegazioni scientifiche, le cause si credevano imputabili a Dio e al suo



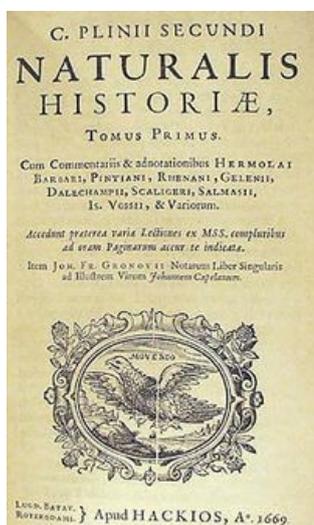
Edizione del 1916 della *Cause delle piante* in cui si descrivono teratologie su *Rosa canina* L.

onnipotente controllo delle manifestazioni atmosferiche direttamente collegate alla presenza delle malformazione (Agrios, 2005). Altre segnalazioni in epoche così lontane sono riscontrate nel testo “*Naturalis Historiae*” di Plinio il Vecchio, pubblicato nell’anno 77. Già nel titolo l’opera si presenta come ricerca a carattere enciclopedico sui fenomeni naturali: il termine *Historia* conserva il suo significato greco di *indagine*, e va notato che la formula ha dato la denominazione alle scienze biologiche, cioè alla *storia naturale* nel senso moderno della locuzione.

La “*Naturalis Historiae*” di Plinio il Vecchio, ha un enorme successo fin dalla sua apparizione ed è una fonte costante e inesauribile di notizie su astronomia, geografia, etnologia, antropologia, fisiologia umana e zoologia, botanica, medicina e piante medicinali, mineralogia, arte e storia dell’arte. Plinio è un grande compilatore, lui stesso afferma che la sua enciclopedia contiene 20.000 fatti desunti da duemila volumi di cento autori diversi, ma oltre a servirsi delle opere altrui è anche un acuto osservatore e un viaggiatore, e il suo atteggiamento di fronte alle razze mostruose, ai nani e ai giganti non è di disgusto, ma di grande tolleranza e di curioso interesse. Il suo stoicismo lo porta a credere che tutto ciò che la natura produce ha

uno scopo, che lo studioso della natura deve cercare sia nelle cose più ordinarie sia in quelle meravigliose. Da Plinio il Vecchio, che opera una classificazione sistematica dei “mostri”, fino al Medioevo, viene operata la distinzione tra gli individui mostruosi e le razze o specie mostruose. I ‘mostri’ vengono classificati principalmente sulla base della loro natura straordinaria: “mostri” non tanto perché deformati, ma perché rari e straordinari. Da questo punto di vista, un mostro si configurava pertanto come una curiosità, un presagio, uno spettacolo insolito.

In Cina, attorno al 750 d.C., si conoscevano metodiche di selezione e riproduzione di peonie con fiori doppi, il fiore venerato in Oriente, e attorno al 1000 vennero coltivate delle varietà di rosa fiore doppio fino a creare la *Rosa chinensis* Jacq., uno degli "antenati" della *Rosa tea* di oggi.



Frontespizio della *Natural History* di Plinio

Attualmente la maggior parte delle rose coltivate hanno questa caratteristica (Needham, 1986).

Gli erboristi del Rinascimento riconobbero i fiori doppi e iniziarono a coltivarli nei loro giardini; Rembert Dodoens pubblicò una descrizione dei fiori-doppi nel 1568, e John Gerard illustrò molti fiori-doppi accanto ai loro omologhi selvatici nel 1597.

Una varietà di fiore-doppio di calendula di stagno fu scoperta e coltivata in Austria alla fine del XVI secolo, divenendo una pregiata pianta da giardino (Wijnands, 1993). Nel Rinascimento si assiste ad un serio tentativo di portare lo studio della teratologia nell'ambito delle indagini anatomiche. Nei trattati sui mostri del XVI e XVII secolo, viene messa in discussione sia la loro derivazione trascendentale, come vendetta divina o

presagio del male, sia il loro essere fenomeno insolito e curioso.

Secondo Martin Weinrich, un naturalista tedesco, nel suo trattato sui mostri "*De ortu Monstrorum*" della fine del XVI secolo, ogni fenomeno che minaccia l'ordine naturale non può essere chiamato 'un mostro'; la teratologia, d'altro canto, non può più essere definita come una manifestazione che si basa essenzialmente sugli eventi insoliti.

Anche il chirurgo francese Jean Riolan e il naturalista italiano Ulisse Aldrovandi nel suo famoso Erbario, intendono la teratologia come scienza per capire la mostruosità esclusivamente in termini di deformità fisica e per stabilire una classificazione delle deformità su criteri anatomici.

Nonostante il vivo interesse per la teratologia, perdurava la tendenza alla collezione di esempi o casi mostruosi reperibili nella realtà, tralasciando ancora l'accordo sulla definizione del termine mostro.

In "*Philosophical Transactions*" della Royal Society, tra il 1665 e il 1780, vi erano oltre 100 comunicazioni relative a forme mostruose e l'Accademia francese delle Scienze pubblicò altri 130 articoli su questo argomento, tra 1699 e 1770.

A causa di profondi mutamenti culturali, stimolati principalmente dalla fine delle guerre di religione, tra la fine del XVI e gli inizi del XVII secolo, i cosiddetti mostri finiscono di essere interpretati come cattivi presagi; d'altro canto le classi colte cominciano a disprezzare questa letteratura, vedendolo come un segno di ignoranza e superstizione popolare, anche se si riscontra un numero crescente di libri sull'argomento.

Entro la fine del XVII secolo, la filosofia naturale aveva fatto un cambiamento importante verso l'adozione di un'ordinata concezione della natura. Le società scientifiche cominciano a contestare "casi meravigliosi" mettendo in discussione le verità di strani fenomeni. La ricerca della verità e la norma cominciano a entrare in conflitto con l'amore del meraviglioso e unico.

Non si può omettere a questo punto il passaggio cruciale della teoria della metamorfosi di Goethe. Il testo del 1790 *Versuch, die Metamorphose der Pflanzen zu erklären* una delle sue opere più commentate, manifesta uno spiccato interesse per i fenomeni irregolari e, soprattutto, per il loro rapporto con la normalità. Nel processo di sviluppo della pianta annuale, Goethe individuò una serie di passaggi obbligati, un ordine preciso di trasformazione delle parti, l'una nell'altra. Goethe aveva poi distinto tre tipi di passaggi tra una forma e l'altra o metamorfosi: la metamorfosi regolare, irregolare e casuale (Goethe, 1790).

La metamorfosi regolare, così come viene descritta, costituisce il caso più "normale" dello sviluppo della pianta annuale; essa però, secondo lo studioso, non è né l'unica possibilità, né il riferimento assoluto a cui le altre varianti devono adeguarsi.

A questo punto diviene possibile tracciare un interessante parallelo con una tendenza che si delineò nella scienza anatomica e biologica all'incirca nello stesso periodo di tempo in cui Goethe compì le sue riflessioni sulle forme naturali. Gli inizi di questa tendenza sono rintracciabili dalla metà del XVIII secolo, quando il modo di guardare alle mostruosità da parte della scienza e della filosofia iniziò a cambiare. Se, nei secoli precedenti, tutto ciò che rappresentava una "stranezza" veniva esposto nelle *Wunderkammer* (Camera delle meraviglie), senza alcun ordine e senza alcun criterio di disposizione interno; nel XVIII secolo la *Wunderkammer* vennero sostituite da particolari sezioni all'interno dei gabinetti di storia naturale che, se spesso erano disposte in modo altrettanto asistemico, si ponevano per lo meno il problema di un possibile ordine.

Un esempio eloquente è la voce "Gabinetto di storia naturale" dell'*Encyclopedie* di Diderot e D'Alembert. Ogni caso particolare di formazione anomala non poteva costituire un caso a sé, perché se le mostruosità non soggiacevano a una ben precisa regolarità, tutti i tentativi di spiegazione e di sistematizzazione sarebbero rimasti infruttuosi (Hagner, 1995).

Infatti Diderot, auspicando la costruzione di un gabinetto di storia naturale, perfetto, progetta di dedicare una sezione ai mostri, che quindi dovranno soggiacere a un certo ordine razionale. I mostri non sono più capricciosi e sfuggenti a ogni regola, sono invece passibili di un ordinamento razionale. Nuovi criteri classificatori, la ricerca assidua di regolarità anatomiche, l'attenzione alle similitudini più che alle differenze attraverso l'importante strumento euristico dell'analogia, erano tutti impulsi che inducevano a inserire i mostri nel corso ordinario della natura, in modo da provare l'esistenza di un ordine razionale e universale. Un problema più generale è dunque alla base di questo mutamento nella



Geoffroy de Saint-Hilaire

considerazione dei mostri: è il problema dell'unità e dell'uniformità della natura, che verrebbero automaticamente negate dall'esistenza di "buchi" nell'ordine generale. La stessa esigenza di unità e uniformità all'interno della natura ha spinto ad accettare l'idea di processi di sviluppo che agiscono universalmente e uniformemente, dando origine sia ai casi

normali che a quelli anormali. Così, i diversi tentativi di formulare teorie soddisfacenti riguardo all'origine dei mostri portarono, negli anni Trenta e Quaranta del XVIII secolo, a un'importante disputa all'interno dell'*Académie de Sciences* di Parigi, nella quale si cercò di spiegare i meccanismi di sviluppo dei viventi, normali e anomali, con argomenti puramente anatomici. Non si arrivò a una risposta definitiva, ma ne nacquero argomenti importanti contro la teoria della preformazione: mentre era imbarazzante pensare a "mostri preformati", l'opposta ipotesi epigenetica, che contemplava una trasformazione graduale delle singole parti, poteva render conto delle formazioni anomale spiegandole come "arresti di sviluppo". In questo modo, tranne in rari casi, i mostri non erano più capricci della natura da esibire in circhi e di cui meravigliarsi, ma esseri appartenenti a pieno titolo allo sviluppo embrionale *normale*, che per qualche motivo era rimasto bloccato a una certa fase.

Le abnormità non venivano ancora spiegate in modo esaustivo, ma si era verificata una piccola rivoluzione: improvvisamente il mostro divenne un oggetto scientifico che poteva servire da banco di prova per teorie generali sugli esseri viventi e poteva portare una migliore comprensione dei processi generali di sviluppo. Tutti questi temi furono ulteriormente chiariti da Isidore Geoffroy de Saint-Hilaire, fondatore, insieme al padre Etienne, della scienza teratologica, che nel 1847 esortava: "*Cessiamo di discutere in termini vaghi sui mostri, e di stupirci davanti alle loro apparenti meraviglie, studiamoli con senno, descriviamoli con esattezza*".

Con la scienza teratologica del XIX secolo si arrivò alla definitiva "secolarizzazione" del mostro, evidente anche nell'abolizione del suo stesso nome: più che di mostri si preferì parlare di *mostruosità*, termine privo di implicazioni metafisiche. I difetti di formazione non venivano più identificati con difetti morali: si sosteneva anzi la perfezione di ogni struttura anatomica, sebbene anomala, e gli esseri spaventosi del XVII secolo divennero, nel corso di cento anni, complete, "innocenti" mostruosità. Goethe condivise certamente la convinzione che confini rigidi tra normalità e anormalità non esistono in natura, non sono fruttuosi per la scienza e anzi rendono artificiosi e fallaci i sistemi di classificazione fondati su questo principio. Goethe adottò lo stesso principio euristico di Etienne Geoffroy de Saint-Hilaire: i fenomeni abnormi possono rivelare molto riguardo ai processi di formazione generali, compiendo spesso "esperimenti a vantaggio dell'osservatore".

Non mancano all'inizio del XIX secolo le elaborazioni più squisitamente letterarie collegate alla fenomenologia dei mostri; primo fra tutti il *Frankenstein* (1818) di Mary Shelley. L'autore, era ben consapevole delle scoperte mediche e scientifiche di altri del suo tempo: lungi dal descrivere un 'freak' (mostro), Shelley descrisse un mostro creato dalla scienza, anticipandone il più benigno carattere.

Il passaggio dei mostri come esseri “dal fuori” ai mostri “deviazioni dal dentro” porta la teratologia, verso la metà del secolo XIX, a diventare una scienza moderna, la cui principale preoccupazione non era più l'indagine sulla natura e le origini dei mostri ma lo studio delle principali anomalie fisiche o malformazioni negli esseri viventi. Non a caso, il naturalista francese Geoffroy Saint-Hilaire nel pubblicare il suo “*Traité de Teratologie*” (1832) - la prima pietra miliare importante nella storia contemporanea della teratologia - ha esplicitamente detto che questa nuova scienza teratologica doveva astenersi dall'utilizzare la parola 'mostro' per descrivere il suo nuovo oggetto di studio.

## 2. LE MALFORMAZIONI NELL'ICONOGRAFIA BOTANICA

I trattati scientifici di botanica al pari di quelli di architettura, astronomia, geografia, ingegneria, matematica, scienze mediche e zoologia, si sono avvalsi sempre di un apparato iconografico chiaro e didattico, con lo scopo di spiegare al lettore i contenuti del testo.

La prima autentica iconografia botanica che ci sia pervenuta risale al 400 d.C. circa. Si tratta del più antico erbario illustrato della tradizione occidentale, il Papiro Johnson, un papiro di cultura greca che è stato ritrovato ad Antinoe, in Egitto. Sui lembi del papiro sono dipinte con chiarezza le figure di due piante, un *Symphytum* (*Boraginaceae*) e una *Phlomis* (*Lamiaceae*), mentre il testo esplicativo è collocato nella parte sottostante, nel modo che sarà proprio di molti altri erbari illustrati. Le figure hanno dimensioni ragguardevoli, soprattutto quella che mostra *Symphytum officinale* L., che arriva a occupare quasi l'intera pagina lasciando solamente poche righe di spazio al testo esplicativo.

In Egitto, durante il Medio Regno, oltre a una pregevolissima produzione letteraria nasce anche una produzione di testi scientifici di notevole spessore culturale, che comprende trattati e manuali di discipline che noi oggi classificheremmo come astronomia, botanica, ingegneristica, matematica, medicina e altre ancora. Osservando manufatti figurativi di altro tipo si evince come nell'Egitto degli ultimi due millenni prima dell'età cristiana, la pratica della raffigurazione del regno vegetale conobbe un'ampia diffusione, con una notevole caratterizzazione delle singole specie.

Secondo molti studiosi, fra i quali l'archeologo e storico dell'arte italiano Antonio Giuliano, verosimilmente si iniziò ad illustrare testi di questo tipo sin dall'antica civiltà egiziana, con illustrazioni varie, disegni schematici e diagrammi.

Pertanto anche lo stesso termine di “erbario”, inteso come collezione di piante essiccate realizzata con finalità e metodologie scientifiche, oppure come museo che custodisce raccolte di piante essiccate, andò trasformandosi comparativamente all’esigenza di raffigurare anche in senso grafico gli esemplari catalogati.

Troppe e irrimediabili sono le perdite, causate dalle guerre, e troppe le forme di distruzione che travolsero queste antiche vestigia del sapere.

Gli erbari figurati come genere letterario, hanno radici antichissime, dopo gli Egizi, anche gli Assiro-Babilonesi lasciarono le loro documentazioni su tavolette di argilla, seguiti dalla tradizione greca e da quella giudaica.

Tra gli erbari figurati, più antichi bisogna ricordare l’opera intitolata *Historia plantarum* del filosofo-naturalista greco Teofrasto (372-287 a.C.), nei quali furono classificate circa 500 piante divise in gruppi in base al diverso portamento (alberi, frutici, suffrutici, erbe), distinguendo quelle spontanee da quelle coltivate; tra quelle spontanee è citata la prima teratologia su *Rosa canina* L. di cui non si possiede un’iconografia esplicativa. A questo erbario, come riporta Plinio nel I secolo d.C., ne seguirono molti altri, purtroppo a noi mai pervenuti, di autori meno noti come Crateo e Diocle, che andarono nel tempo arricchendosi di tentativi d’illustrazioni a colori.

Le opere dei classici, Dioscoride, Galeno, Plinio, furono alla base degli studi rinascimentali e restarono insostituibili fino al XVIII secolo quando Carlo Linneo introdusse la classificazione scientifica delle piante, da cui prese avvio la moderna botanica. Gli incunaboli ricalcano ancora le presentazioni medievali e mostrano, più dei manoscritti, immagini ripetute in modo rigido e schematico senza alcuna verosimiglianza. Successivamente, con le opere di Brunfels, di Fuchs, di Mattioli, di Aldrovandi si ricorse a immagini sempre più aderenti alla realtà, frutto di uno studio condotto direttamente sugli esemplari. Con Fabio Colonna, nel Seicento, si registrò un passo in avanti nella raffigurazione delle piante con l’utilizzo della tecnica dell’incisione su rame che permise una maggiore aderenza alla realtà per la resa di particolari anche minuti. Splendide sono le tavole di Maria Sibylla Merian e di Elisabeth Blackwell, che divennero le più importanti pittrici naturalistiche della prima metà del Settecento.

Tra le innumerevoli iconografie che trattano espressioni del regno vegetale, compaiono alcune opere con visibili anomalie a carico delle parti epigee. La ricerca di teratologie nelle iconografie botaniche ha portato a una piccola elencazione di specie ben rappresentate da studiosi che sono stati in grado di illustrare figure di piante e parti anatomiche dagli aspetti insoliti.

La prima iconografia, rappresentativa in tal senso, risale al 1597, ad opera dell’erborista inglese John Gerard (1545-1611), sovrintendente dei giardini di William Cecil, consigliere delle regina Elisabetta, che nel 1597 pubblicò *Herball, or Generall Historie of Plantes*, un ampio e illustrato libro, considerato l’opera botanica inglese più diffusa del XVII secolo. Nell’iconografia riportata in Figura 2, Gerard rappresenta anomalie su due esemplari di *Hyacinthus orientalis* L., uno con

le foglie sul gambo e l'altro con fiore doppio. Ancora prima, anomalie a carico dell'apparato florale osservate in un *Ranunculus* L. vengono illustrate da Collaert in *Florilegium ab Adriano Collaert et a Philippo Gallaco editum*, del 1590 (Fig. 1).

Suggestive sono le iconografie ad opera del botanico, farmacista, collezionista nonché tipografo Basilius Besler, riportate in *Hortus Eystettensis*, edito nel 1613, in tre volumi, con 367 calcografie acquerellate. L'opera è stimata tra le più importanti dell'iconografia botanica europea, per l'eccezionale ricchezza di specie rappresentate, in gran parte medicinali, e per l'esuberanza di forme e colori che la abbelliscono. In due illustrazioni (Fig. 3, Fig. 4) sono molto bene rappresentate teratologie a carico del fusto di *Fritillaria imperialis* L. e di un non meglio identificabile *Lilium cruentum polyanthos*: in entrambi i casi è ben visibile una fasciazione a carico del fusto e una proliferazione florale.

Non meno importanti sono le iconografie di Maria Sibylla Merian. Il suo vivo interesse per la metamorfosi delle farfalle, la condusse a rappresentare, attraverso innumerevoli tavole, il loro diverso periodo di sviluppo, insieme con le piante sulle quali si situano abitualmente e delle quali si nutrono. Nel 1680, pubblicò il *Florum fasciculi tres*, comprendente 36 tavole di incisioni colorate di fiori con particolare cura dei dettagli. Tra queste immagini sono ben riprodotte anomalie a carico dei fiori di un *Narcissus* L. (Fig. 5) e di *Celosia argentea* L. (Fig. 6).

Anche Alida Withoos, fu pittrice e illustratrice olandese del secolo d'oro; si dedicò molto alla pittura di fiori, frutta ed insetti, con uno stile raffinato e un buon utilizzo del colore, sia a tempera che ad olio. Negli anni '80 entrò in contatto con un gruppo di pittori famosi e ricchi collezionisti di piante. Ebbe così possibilità di lavorare come illustratore botanico, in particolare per Agnes Block (1629-1704) e per l'Orto botanico di Amsterdam. Lavorò anche con Maria Sibylla Merian ad alcuni disegni commissionati dallo stesso Block. Inoltre eseguì dodici o tredici illustrazioni per l'*Atlante Monincks* del 1698. Questo atlante contiene 420 acquerelli di piante dell'Orto botanico di Amsterdam, ed è proprio in questo atlante che la Withoos rappresentò al pari della Merian l'iconografia di *Celosia argentea* L., mostrandone la cretatura dell'infiorescenza (Fig. 7).

Tra i suoi innumerevoli capolavori pittorici, Bartolomeo Bimbi riprodusse, nel 1707, uno stravagante piede di cavolfiore (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis* (L.) Metzg.) con evidente fasciazione, accompagnata da piccole infiorescenze bianche del vegetale (Fig. 8). Questo dipinto fu donato a Cosimo III dal senatore Pier Capponi, ed attualmente è esposto nella Sezione Botanica del Museo di Storia Naturale dell'Università di Firenze.

Nell'opera botanica siciliana, più ricca di incisioni, il *Phanphyton siculum* di Francesco Cupani (1713), si riporta il disegno di una pianta fasciata riferibile ad una *Anthemis* (Fig. 9).

Uno dei primi disegni riguardanti anomalie su succulente è ben illustrato dal botanico olandese Nikolaus Joseph von Jacquin intorno al 1806 (Rowley, 2006). Nella tavola 9 del *Folio* sulle Stapeliae (Parte I), disegna *Huernia reticulata*

(Masson) Haw. con crestatura multiplex a ventaglio, completamente regredita a germogli normali (Fig.10).

Un testo di assoluta rarità naturalistica rimasto per tanto tempo inedito, l'*Acis Hortus Regius* – stampato nel 2007 da F.M. Ricci – annovera una raccolta di oltre 750 tavole di svariate piante in parte officinali, dipinte a tempera e acquerello dal pittore acese Emanuele Grasso nei primi decenni dell'800 (Raimondo & Mazzola (2007). L'opera, datata 1811 e redatta su commissione del farmacista di Acireale Giuseppe Riggio – cultore di botanica ed esperto di piante medicinali – permette di rilevarvi due tavole, rispettivamente con una inusuale proliferazione di frutti sulla stessa bacca di fico d'India [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.] e una fasciazione a carico dell'estremità dello scapo e del capolino di carciofo (*Cynara scolymus* L.) (Fig. 11, Fig. 12).

Rilevante anche per le osservazioni sulle cause di determinate teratologie carpologiche è, altresì, la tavola di Gallesio (1817) a corredo del suo articolo sul Fico fetifero (Fig. 13).

Sfogliando alcuni testi online facente parte della collezione di libri dell'Orto botanico di New York, in *Flora Medico-Farmaceutica*, del chirurgo Felice Cassone risalente al 1850, si ritrova un disegno di *Hyssopus officinalis* L. che mostra ingrossamento di una parte dell'infiorescenza (Fig. 14). Tale testo è stato considerato un erbario farmaceutico specializzato utile ai farmacisti dell'800, poiché grazie all'eccezionale iconografia che descriveva fedelmente l'immagine delle parti da utilizzare come droga, permetteva ai farmacisti di affinare la capacità di riconoscimento delle piante medicinali.

Nello stesso secolo, è l'iconografia di Francesco Minà Palumbo, medico siciliano con spiccato interesse naturalistico per la flora delle Madonie a costituire una documentazione scientifica di grande valore. Lo studioso, con mano esperta spesso corredeva i reperti (piante, animali, fossili, utensili, ecc.) di bellissimi disegni acquerellati. Restano più di 400 tavole, di cui 200 con rappresentazioni vegetali, 191 di uccelli, rettili e anfibi, nel museo a lui dedicato nella natia Castelbuono (Mazzola e Raimondo, 2011). Tra questi figura una malformazione a carico dell'infiorescenza di una pianta di *Plantago serraria* L. (Fig. 15).



Fig. 1. *Ranunculus* L. - Adrian Colaert, 1590

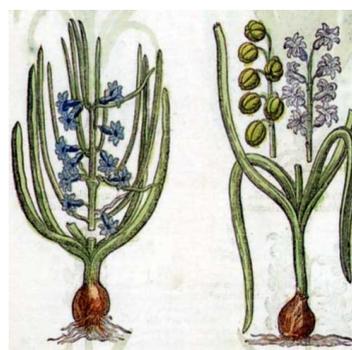


Fig. 2. *Hyacinthus orientalis* L. - John Gerard, 1597



Fig. 3. *Fritillaria imperialis* L.  
Basilius Besler, 1613

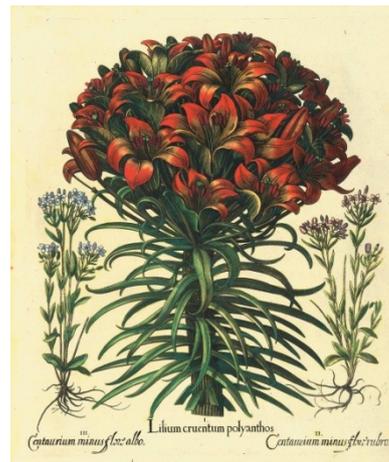


Fig. 4. *Lilium cruentum polyanthos*  
Basilius Besler, 1613



Fig. 5. *Narcissus* L.  
Maria Sibylla Merian, 1680



Fig. 6. *Celosia argentea* L.  
Maria Sibylla Merian, 1680



Fig. 7. *Celosia argentea* L.  
Alida Withoos, 1698



Fig. 8. *Brassica oleracea* L. subsp. *botrytis* (L.) Metzg.  
Bartolomeo Bimbi, 1707

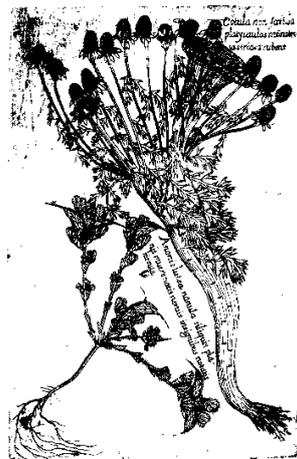


Fig. 9. *Anthemis incassata* Loisel.  
Francesco Cupani, 1713



Fig. 10. *Huernia reticulata* (Masson) Haw.  
Nikolaus Joseph von Jacquin, 1806



Fig. 11. *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.  
Giuseppe Riggio, 1811



Fig. 12. *Cynara scolymus* L.  
Giuseppe Riggio, 1811

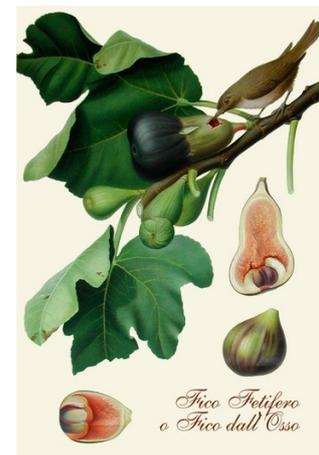


Fig. 13. *Ficus carica* L. "Dell'Osso"  
Giorgio Galesio, 1817



Fig. 14. *Hyssopus officinalis* L.  
Felice Cassone, 1850



Fig. 15. *Plantago serraria* L.  
Francesco Minà Palumbo, 1855

### 3. MANUALI SULLE TERATOLOGIE IN BOTANICA

Nell'ambito del regno vegetale, lo sviluppo della teratologia come studio scientifico si fa risalire soltanto all'ottocento. Fino ad allora le teratologie venivano trattate dai botanici come casi curiosi e insoliti.

Nel 1814 viene pubblicato, sottoforma di manuale, dalla P.-J. Loss, Libraire-Éditeur di Parigi, il primo trattato sulle teratologie vegetali *Élément de Tératologie végétale* scritto da Alfred Moquin-Tandon, professore di botanica e direttore dei giardini botanici di Tolosa.

L'opera, suddivisa in tre parti, priva di immagini, cita casi teratologici riscontrati su oltre 800 specie. Nella prima parte, l'autore descrive gli organi vegetali delle piante e la loro simmetria. Le anomalie vegetali vengono poi trattate come abnormità di specifici organi o di strutture generali di una pianta e viene dedicato ad esse un capitolo distinguendole in lievi e gravi (mostruosità).

La seconda parte del volume tratta soltanto le anomalie lievi ovvero quelle che non ostacolano le funzioni della pianta e che sono legate principalmente a fattori ambientali. Queste anomalie classificate come "varietà" sono suddivise in 4 classi, a loro volta suddivise in ordini. La prima classe riguarda la varietà di colorazione, comprendente tre ordini caratteristici (albinismo, cromismo e alterazione), la seconda classe viene suddivisa in due ordini (anomalie per la diminuzione e per aumento di peli), la terza classe in due ordini (rammollimento e indurimento) e la quarta includente due ordini (nanismo e gigantismo).

La terza parte è la più consistente di tutta l'opera: conta circa 300 pagine dedicate alle malformazioni gravi ovvero alle mostruosità ed è tanto ampia da essere suddivisa in 4 libri. Il primo libro descrive le mostruosità legate a diminuzione di volume (atropia) e mostruosità per aumento di volume (ipertrofia), entrambe divise in modificazioni degli organi appendicolari o degli organi assili. Le ipertrofie degli organi assili, a loro volta, comprendono tre sottocapitoli: le elongazioni, i rigonfiamenti e le fasciazioni. Il secondo libro descrive: mostruosità dovute ad alterazioni irregolari; deformazioni degli organi appendicolari; deformazioni degli organi assili per avvolgimento e torsione; mostruosità per alterazioni regolari di forme o di peli; trasformazione di organi (metamorfosi di organi appendicolari e di organi fondamentali; metamorfosi di frutti e virescenza; metamorfosi di sepali, di petali, di stami e pistilli; metamorfosi di organi accessori e metamorfosi di individui elementari quali boccioli, fiori e frutti. Il terzo libro tratta mostruosità riguardanti la non corretta disposizione degli organi. Nel quarto libro vengono descritte mostruosità dovute ad aborti degli organi appendicolari e assili e quelle causate dalla moltiplicazione degli organi appendicolari, moltiplicazione e proliferazione di fiori e frutti.

Successivamente, la Ray Society di Londra, pubblica due opere: *Vegetable Teratology* di Maxwell T. Masters, pubblicata in un unico volume nel 1869, e

*Principles of Plant Teratology* di Wilson Crosfield Worsdell, pubblicata in due volumi nel 1915 e nel 1916. Ambedue propongono una classificazione delle aberrazioni vegetali, inventando o adottando la necessaria terminologia, addentrandosi in lunghe spiegazioni sulle origini delle anomalie e arricchendo i testi con numerose illustrazioni.

L'opera di Masters divenne un riferimento importante per i botanici del tempo e rimase tale per molti anni. Nella compilazione del suo volume l'autore fa riferimento a molti casi riportati da Moquin-Tandon e, con una certa prudenza, cerca di esporre in maniera chiara e dettagliata le mostruosità a carico degli organi delle piante. Masters divide in libro in tre parti; nella prima descrive anomalie causate dall'unione degli organi (coesione, adesione); la seconda parte tratta del distacco di organi; la terza parte descrive i cambiamenti nella disposizione degli organi rispetto alla loro normale posizione (spostamento di un organo in parti insolite della pianta ed eterotassia) o la comparsa di un organo su parti insolite, come crescita di una foglia su una radice o la proliferazione di foglie e frutti.

Negli anni tra il 1869 e il 1915 la conoscenza sulle anomalie strutturali aumenta notevolmente e Worsdell presenta *The Principles of Plant-Teratology*. Nella prefazione l'autore considera l'opera di Masters, che pure aveva avuto un enorme successo, un'opera obsoleta per le modalità di trattamento dei casi e poco organizzata dal punto di vista scientifico. Nondimeno incautamente Worsdell sposa tesi anacronistiche su ereditarietà e ontogenesi in un lavoro che non intendeva essere solo una presentazione di interessanti e curiosi "mostri" ma voleva dare anche un importante ed inedito contributo sull'origine evolutiva delle anomalie degli organi delle piante. Il primo volume si divide in cinque sezioni: la sezione dei funghi, ordinata secondo il tipo di anomalia (dicotomia e fasciazione, proliferazione, ramificazione accidentale, imenio invertito, cambiamento di forma e fusione); la sezione sulle briofite, suddivisa in anomalie degli organi vegetativi e delle sporofite; la sezione sulle anomalie riguardanti le radici che viene suddivisa in capitoli riguardanti ramificazione, fusione, cambiamenti nella crescita ed emissione di radici avventizie; la sezione riguardante anomalie dei fusti e dei germogli e una sezione sulle malformazioni delle foglie.

Nel secondo volume suddiviso in tre sezioni, descrive anomalie riguardanti gli organi fiorali: differenziazione; semplificazione strutturale ovvero lignificazione dei peduncoli fiorali; formazione di fiori avventizi.

Carattere diverso ha invece l'opera di Albert Julius Otto Penzig, un botanico e ricercatore scientifico tedesco che volge i suoi interessi alla teratologia vegetale; l'opera *Pflanzen-Teratologie* fu pubblicata in due edizioni, la prima pubblicata dalla Druck von A. Ciminago di Genova nel 1894 e la seconda da Verlag von Gebrüder Borntraeger di Berlino nel 1922. A differenza delle altre, si presenta come una raccolta bibliografica di tutti i casi riscontrati su oltre mille specie dai diversi autori che si erano interessati all'argomento.

#### 4. DALLA TERATOLOGIA AL CONCETTO DI MALATTIA

Lo sviluppo degli studi di anatomia, di fisiologia e di patologia vegetale nei secoli XVI e XVII, mutò il quadro di interpretazione delle teratologie in campo vegetale. Fino ad allora, il concetto di mostruosità non si associava a quello di malattia, poiché le conoscenze sull'eziologia erano piuttosto limitate e influenzate dalle convinzioni del tempo. Alcuni eventi, riguardanti la moria di colture vegetali di prima necessità, erano stati talmente straordinari da essere riportati in numerosi passi del libro dell'Antico Testamento della Bibbia (circa 750 a.C.) e molti altri eventi simili vennero descritti nelle due opere del padre della botanica Teofrasto (300 a.C.) il quale, discostandosi leggermente dalla credenza delle malattie come maledizioni e punizioni inviate da Dio al popolo per aver commesso peccati, lega gli avvenimenti alle condizioni climatiche regolate dall'Onnipotente.

Qualunque osservazione riguardante piante malate o affette da strane anomalie non ebbe nessuna spiegazione, se non quella religiosa o superstiziosa, fino alla fine del XVI secolo quando, l'invenzione del microscopio, consentì agli scienziati di osservare molti microrganismi precedentemente invisibili. Gli scienziati, così come i laici, divennero pertanto i primi ad ipotizzare i microrganismi come responsabili della decomposizione, malformazione e morte di tessuti ed organi umani ed animali.

Da questo momento si sviluppa l'interesse per la patologia vegetale (dal greco antico *πάθος*, *pathos*, "sofferenza" e dal latino *-λογία*, *-logia*, "studio"), quale branca della botanica e divisa in due settori: la patologia generale, che si occupa delle manifestazioni innaturali delle piante dal punto di vista più generale (ad esempio dei meccanismi di determinazione o di studi anatomici), e la patologia speciale, che ha per oggetto lo studio delle malattie provocate da agenti parassiti animali, vegetali, fungini, batterici, virali, fitoplasmici e le alterazioni delle piante dovute ad agenti di inquinamento e fisiopatie causate da fattori climatici e/o meteorologici, pedologici e/o nutrizionali. Una scienza che si sviluppa per un pratico e nobile obiettivo: proteggere il cibo a disposizione di uomini e animali.

Giovanni Targioni Tozzetti (1712-1783) fu il primo scienziato italiano che si dedicò allo studio della botanica compiendo ricerche mirate per la scoperta dei parassiti vegetali, con forte attenzione anche agli aspetti pratici ed è, pertanto, considerato il fondatore della patologia vegetale in Italia.



I risultati da lui ottenuti riguardo alla causa della terribile carestia che infierì sul frumento, nell'Italia centrale, tra il 1765 ed il 1767, furono molto rilevanti e pubblicati nella sua opera fondamentale "*De alimenta urgentia*" con sottotitolo "*Alimurgia*" (intesa come la scienza che riconosce l'utilità di cibarsi di piante spontanee soprattutto il periodi di carestia).

Egli individuò il fungo *Puccinia graminis* Pers. quale agente della ruggine del frumento. Estese le sue ricerche ad altre piante, in particolare presso l'Orto botanico di Firenze, ed individuò una decina di parassiti crittogamici.

Nel frattempo i primi cultori di medicina vegetale cercavano di rinnovare e di raffinare l'interpretazione delle malattie delle piante da un punto di vista agrario, istituendo addirittura dei premi per gli studiosi che avessero risolto particolari problemi fitopatologici.

Nella seconda metà del XVIII secolo, il concetto di parassitismo e dei rapporti di causalità nella determinazione delle malattie delle piante, diviene un fatto compiuto e si trovano documenti anche nelle classiche Enciclopedie dell'epoca. Quando alla fine del '700 gli studi sulle malattie delle piante furono affrontati dagli agronomi, più interessati alla risoluzione degli aspetti pratici della cura della malattia, il processo di evoluzione degli studi di fitopatologia subì un drastico rallentamento, per riprendere splendore grazie all'intervento di botanici, micologi e fisiologi quali Persoon, Prèvost, Link, Nees e Bank. L'impatto delle loro ricerche è rappresentata nell'opera "*Physiologie végétale*" di De Candolle, in cui viene dato un quadro completo dei diversi casi di malattia, in cui si accetta il concetto di parassitismo e di infettività dei patogeni, il riconoscimento dell'influenza dei fattori ambientali e in alcuni casi anche indicazioni terapeutiche.

Accanto al concetto di pianta sana o normale, che può svolgere la sua normale funzione fisiologica al meglio delle sue potenzialità genetiche, si sviluppa quello di pianta malata, quando le cellule non sono in grado di effettuare una o più funzioni. All'inizio del secolo XIX, si diffonde l'ipotesi dell'esistenza di malattie delle piante ad opera di microrganismi in grado di interferire con le attività cellulari, di alterarne o inibirne il normale funzionamento fino alla morte della pianta. In un primo momento l'interazione tra pianta e parassita è localizzata a una o poche cellule ed è invisibile ma quando la reazione si diffonde a parti della pianta, i tessuti iniziano a sviluppare cambiamenti visibili ad occhio nudo, mostrando sintomi ed il tipo di funzione fisiologica interrotta.

La malattia nelle piante, può essere definita come *una deviazione dello stato di armonia nello svolgimento delle funzioni vitali (di ricambio e di sviluppo) della pianta* (Goidànich, 1959). E' una serie di risposte prima invisibili e poi visibili delle cellule e dei suoi tessuti vegetali a un organismo patogeno o a fattori ambientali che si traducono in cambiamenti anomali della forma, della funzione o dell'integrità della pianta e che può portare alla parziale o totale morte di parti della stessa. Il parassita/agente patogeno o tossine da esso prodotte possono raggiungere le vie di conduzione determinando sintomi a tutte le parti della pianta e sindromatologie diffuse.

La malattia è, quindi, definita quale il prodotto del mutuo conflitto e reciproca influenza tra la pianta ed il patogeno. Più precisamente è l'interazione reciproca tra patogeno (P), pianta o suscetto (S) ed ambiente (A) secondo lo schema generale del "triangolo della malattia" che sintetizza il concetto in base al quale solo al

determinarsi contemporaneo delle condizioni favorevoli la malattia per i tre fattori (P-S-A) che essa può determinarsi. Solo in condizioni in cui il patogeno sia presente ed in fase “attiva”, che la pianta sia suscettibile (ad esempio fase fenologica o specie/varietà suscettibile) e che le condizioni ambientali siano favorevoli alla vita e sopravvivenza del patogeno ed a rendere la pianta suscettibile, avremo il processo della malattia. Lo schema del triangolo della malattia estrinseca un concetto importante in base al quale solo la conoscenza dei tre fattori determinanti la malattia e le eventuali azioni combinate su di essi possono consentirne il suo controllo limitando o prevenendo danni alla pianta. La lotta efficace alle malattie delle piante risiede, infatti, solo nell’uso combinato di interventi che agiscono contemporaneamente su ambiente, patogeno e pianta. Questo è un concetto critico soprattutto per quelle malattie per cui non sono utilizzabili chemioterapici o fitofarmaci, che viste le recenti e future direttive europee, potranno essere applicati solo per le malattie fungine.

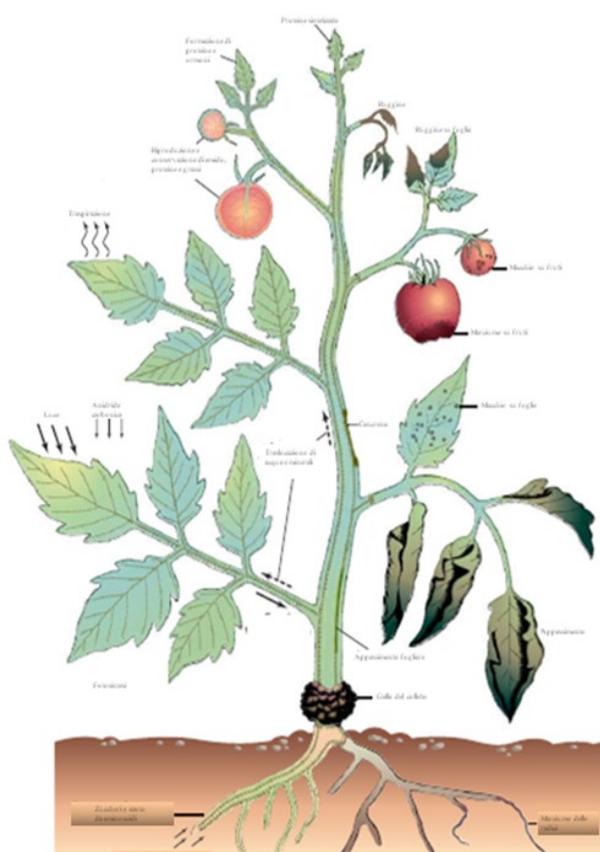


Fig. 16. Rappresentazione schematica di una normale funzione di base in una pianta (a sinistra) e tipi di interferenze con queste funzioni (a destra) causate da alcuni tipi di malattie delle piante.

Secondo Agrios (2005), è possibile classificare le fitopatie in infettive e non infettive a secondo che l'agente causale sia un organismo patogeno che determini la malattia con processi di infezione, instaurarsi di rapporti trofici (biotrofici e necrotrofici) e disseminazione del patogeno (ciclo della malattia) o sia un fattore ambientale il cui processo di determinazione non abbia nessuna delle caratteristiche precedenti. I principali agenti di malattia sono:

- malattie infettive o da agenti biotici, quelle causate da funghi, procarioti (batteri e fitoplasmi), da virus e viroidi, da nematodi, da parassiti superiori,
- malattie non infettive o da agenti abiotici, causate da troppo basso o troppo alto livello di temperatura, carenza o eccesso di umidità nel terreno, da carenza o eccesso di luce, da carenze nutrizionali, da tossicità del terreno o ambientale, da acidità o alcalinità del suolo (pH), da tossicità da pesticidi, da pratiche culturali improprie.

Un organismo patogeno è, quindi, un agente biotico che può causare malattie nelle piante, in grado di disturbare il metabolismo delle cellule vegetali attraverso produzione di enzimi, tossine, regolatori della crescita, e altre sostanze che secernono e assorbono, quali alimenti, dalle cellule ospiti.

L'interazione tra patogeno e pianta avviene secondo lo schema del ciclo della malattia con le fasi di infezione (penetrazione e colonizzazione dei tessuti) e successiva evasione. In base al tipo di interazione che pianta e patogeno instaurano si parla di rapporto o colonizzazione necrotrofica, quando il patogeno nel suo rapporto di parassitismo porta a morte i tessuti o la pianta che colonizza per trarre sostanze necessarie al suo ciclo vitale, biotrofica, quando il rapporto garantisce la sopravvivenza dell'ospite anche se diversi processi fisiologici vengono disturbati con manifestazione sintomi. Instaurano un tipico rapporto necrotrofico diversi funghi (es. basidiomiceti agenti di carie del legno) mentre virus, viroidi, fitoplasmi diversi batteri determinano rapporti biotrofici.

La maggior parte delle malattie causate dall'azione di parassiti vegetali quali batteri, funghi, virus, viroidi e fitoplasmi sono caratterizzate da alterazioni fisiologiche profonde determinatesi dall'interazione complessa tra la pianta ed il patogeno. L'alterazione fisiologica è resa visibile da sintomi o segni macroscopici che, in termini causali, sono determinati o da meccanismi di difesa delle piante o da azione diretta dei patogeni (Fig. 16).

Gli organismi vegetali si difendono dall'azione dei patogeni con azioni plasmatiche o biochimiche specifiche che determinano manifestazioni visibili quali, ad esempio, malformazioni di organi per accrescimento di volume (ipertrofia) o di numero (neoplasia) delle cellule, o la morte programmata delle cellule e conseguente necrosi di parti di tessuti. In generale, però, l'immunità acquisita, molto frequente nel regno animale, non è diffusa in quello vegetale, fra le cui componenti non è stata ancora accertata la formazione di anticorpi.

Tra i danni diretti si può citare l'azione di funghi micopatogeni che, tramite lisi cellulare attuata durante i loro processi trofici (neurotrofici), causano marciumi o necrosi di tessuti. Se l'infezione è localizzata nei tessuti radicali l'esito macroscopico, determinato da disturbi nell'assorbimento e trasporto dell'acqua e sostanze nutritive dal terreno allo xilema, è l'appassimento o morte della pianta. Le infezioni e sintomi (necrosi, ingiallimenti, etc) a carico delle foglie interferiscono con la fotosintesi; la localizzazione ed infezioni di patogeni (virus, fitoplasmi, funghi) nelle cellule floematiche causano malattie per interferenza nella traslocazione verso il basso dei prodotti fotosintetici.

Alcuni agenti patogeni possono causare la malattia crescendo e moltiplicandosi in vasi xilematici o floematici, bloccando così il trasporto di acqua e zuccheri verso l'alto o verso il basso attraverso questi rispettivi tessuti.

I fattori ambientali capaci di causare malattie (abiotici) oltre a determinare sintomi diretti sulla pianta, che possono però regredire una volta che il fattore viene eliminato (es. concimazioni, azione sui volumi di adacquamento, etc), creano condizioni generali di sofferenza nella pianta con conseguenze più o meno gravi sulla produzione e spesso favorendo l'instaurarsi di malattie parassitarie.

## **5. TERATOLOGIA VS SEMEIOTICA E ANATOMIA PATOLOGICA**

Una delle branche della Patologia vegetale è la semeiotica e si occupa dello studio dei sintomi o segni di una malattia, con applicazioni sia nella diagnostica che nello studio dei meccanismi di interazione o patogenesi.

Il parallelismo tra semeiotica, e più in generale, tra patologia vegetale e teratologia può essere considerato criticabile se viene preso in considerazione lo scopo principale delle due scienze. La patologia vegetale studia i sintomi o malformazioni o deviazioni dallo stato normale di una specie vegetale quali segni di una malattia ed allo scopo di definirne la causa (agente causale o patogeno) e la cura. Un'accezione tradizionale della teratologia la rende legata solo ad un interesse "collezionistico". Una visione integrata delle due scienze potrebbe, invece, proporre una visione più attuale di tale branca della botanica. A tale scopo si può fare coincidere il concetto di sintomo, termine usato in Patologia vegetale e legato ad un processo patogenetico indotto da un agente patogeno, a quello di malformazione o teratologia. Questo tipo di uso della terminologia non mira ad escludere quelle malformazioni o deviazioni dalla norma determinate da "cause genetiche" da definire, quindi, come variazioni trasmissibili alle generazioni successive ed oggetto della teratologia ed, in senso lato, anche della patologia vegetale. A tale proposito basti citare, come esempio, il caso di virus patogeni trasmessi per seme che determinano malattia sulle generazioni successive ottenute.

I sintomi delle piante vengono distinti in: modificazioni cromatiche, necrosi ed alterazioni degenerative, soluzioni di continuità e distacco di parti, modificazioni di forma e dimensioni.

– Modificazioni cromatiche: alterazioni di portata cito-istologica che si manifestano in tutti i vegetali i cui organi/tessuti/organelli sono dotati di capacità cromatiche. Sono sintomi abbastanza comuni, includono cambiamenti di colore e possono verificarsi in tutti gli organi della pianta in seguito alla scomparsa o attenuazione delle tinte normali, oppure per insorgenza di tinte diverse. Si parla di eziolamento (fenomeno reversibile) quando le modificazioni del colore sono causate da deficienza di luce; albinismo (fenomeno irreversibile) o variegatura, in cui le foglie o altri tessuti di organi generalmente di colore verde rimangono parzialmente o totalmente bianchi; mosaico, che può considerarsi un aspetto della clorosi e nel quale si ha una decolorazione a chiazze, a cerchi, a stelle, di tutto o di parte del parenchima fogliare; striatura, ovvero la maculatura lineare, clorotica, o a tinte vivaci; argentatura o piombatura, che si manifesta nel lembo florale a seguito del distacco degli elementi istologici superficiali e successivo inserimento fra di essi di strati d'aria su cui la luce si rifrange; melanosi, che consiste nell'imbrunimento o annerimento, tipica di organi carnosì, per trasformazione in pigmenti scuri (melanina) di sostanze incolori preesistenti nei tessuti allo stato di normalità.

– Necrosi ed alterazioni degenerative: con il termine marciume si indica qualsiasi processo che modifica la consistenza dei tessuti, può essere marciume secco se si tratta di indurimento o molle se si ha rammollimento; marciume acquoso se la perdita di consistenza dei tessuti è accompagnata da emissione di liquido, tipico di frutti, tuberi e radici. Una tipologia specifica marciume secco è la carie con cui si indica la trasformazione di un tessuto compatto in friabile o polverulento. La necrosi è lo stadio finale di altri sintomi, in alcuni casi l'alterazione è così violenta che la morte è il primo sintomo che si manifesta; appassimento e avvizzimento sono fenomeni conseguenti ad una perdita del contenuto normale acquoso dei tessuti. L'appassimento è un fenomeno transitorio da cui le piante possono riprendersi col ristabilimento dell'equilibrio idrico; l'avvizzimento è un fenomeno stabile e si instaura quando la cessione di acqua ha oltrepassato i limiti per mantenere integra la funzione della cellula.

– Soluzioni di continuità e distacco di parti: cancro, con cui si intende una lesione localizzata solitamente in organi legnosi, più raramente in quelli erbacei, derivante dall'alterazione e dalla scomparsa degli elementi periferici in modo che risulti una ferita aperta attorno alla quale si possono instaurare dei processi di reazione iperplastica; scabbia, con alterazioni superficiali ad aspetto forforaceo-polveroso di organismi carnosì; antracnosi, indicante lesioni subrotondeggianti, leggermente infossate nei tessuti, a bordi incisi e regolari e che al centro presentano piccole fessurazioni che facilmente si ricoprono di

materiale di consistenza cerosa; il distacco e caduta di foglie, fiori e frutti (rispettivamente filloptosi, pantoptosi, carpoptosi) assume un aspetto patologico quando avviene in momenti differenti da quello caratteristico per il tipo di pianta e di organo che si considera.

Modificazioni di forma e dimensioni: nanismo e gigantismo, consistente in una notevole diminuzione od aumento delle dimensioni della pianta; accorciamento degli internodi e conseguente accostamento, che porta ad una riduzione delle dimensioni della pianta; modificazioni del portamento e della simmetria di una pianta, ad esempio alcune piante possono assumere un aspetto eretto piuttosto che procombente, altre piante, da acauli a caulescenti o perdono la simmetria delle strutture aeree per riduzione o proliferazione delle ramificazioni. Le foglie mostrano deformazioni o malformazioni con sintomi quali: arricciamento, accartocciamento e arrotolamento del lembo; bollosità, per accrescimento esagerato dei tessuti internodiali ed il loro successivo rigonfiamento; lacinatura o arresto di differenziazione dei tessuti internodiali con accentuazione della lobatura fino a che foglie semplici assumono l'aspetto di foglie composte; la polifilia e la oligofilia, consistenti nella trasformazione in composte foglie originariamente semplici e viceversa. Nei rami: scopazzi, consistenti in un aumento del numero delle ramificazioni primarie e secondarie che vengono poi a costituire un assieme affastellato e asimmetrico; blastomania, caratterizzata da esagerata produzione di gemme per risveglio di gemme dormienti e formazione di strutture irregolari; rosetta, con diminuzione dello sviluppo degli internodi insieme a blastomania; fasciazione, anch'esso determinato da blastomania di gemme che si dispongono parallelamente facendo perdere la sezione cilindrica ad organi quali rami, peduncoli, rachidi e radici. Spesso all'appiattimento si accompagna una torsione a cerchio o a spirale (spiralismo). Negli organi fiorali: virescenza, consistente in trasformazioni degli annessi fiorali in elementi fogliiformi anche per inverdimento dei tessuti fiorali. Altri sintomi di modificazione di forma sono: tumori e galle (o cecidi), risultanti da un accrescimento anormale di un gruppo di cellule che prendono l'aspetto di una massa rotondeggiante; enazioni, proliferazioni, dei tessuti del parenchima fogliare, localizzate in corrispondenza delle nervature; erinosi, produzione anormale per forma e per numero, di peli o tricomi e che assumono l'aspetto di un feltro spesso.

Alla luce della classificazione dei sintomi adottata in patologia vegetale appaiono direttamente correlati al concetto della teratologia quelli raggruppati nelle modificazioni di forma, processi patogenetici determinati principalmente da alterazioni fisiologiche a carico delle secrezioni ed interazioni di ormoni diversi della pianta o ad emissione diretta di sostanze ormonosimili da parte di patogeni per lo più appartenenti al gruppo dei procarioti.

I principali patogeni vegetali che determinano tale gruppo di sintomi, in particolare le modificazioni di forma quali fasciazioni o proliferazioni di gemme, appartengono al gruppo dei procarioti e son rappresentati da alcune specie batteri e

dalla stragrande maggioranza dei fitoplasmi, procarioti privi di parete ed a localizzazione floematica nelle piante.

## 6. CLASSIFICAZIONE GENERALE DEI PROCARIOTI PATOGENI DELLE PIANTE

I batteri fitopatogeni appartengono alle divisioni *Gracilicutes* e *Firmicutes* del regno *Procaryotae* e comprendono specie Gram-negative e Gram-positive.

Sono oggi noti 26 generi di batteri fitopatogeni (escludendo i sinonimi *Pectobacterium* e *Rhizobium*) tradizionali e 3 generi di batteri “fastidiosi” a localizzazione xilematica (*Xylella*, *Liberobacter*, *Phlomobacter*) per un totale di 108 specie ufficialmente riconosciute (Agrios, 2005).

Regno: Procarioti

### **Batteri — con membrane cellulari e parete cellulare**

Divisione: Gracilicutes — Batteri Gram-negativi

Classe: Proteobacteria — Batteri unicellulari

Famiglia: Enterobacteriaceae

Genere: *Erwinia*, agente del fuoco batterico in numerose rosacee coltivate, arboree e arbustive

*Pantoea*, causa appassimento del mais

*Serratia*, *S. marcescens*, batterio floematico che causa la malattia dell’ingiallimento della vite, nelle cucurbitaceae

*Sphingomonas*, causa macchie marroni in meloni gialli Spagnoli

*Pectobacterium* causa marciume molle e gamba nera della patata

Famiglia: Pseudomonadaceae

Genere: *Acidovorax*, agente di maculature fogliari in mais orchidee e cocomero

*Pseudomonas*, agente di maculature fogliari, appassimento vascolare, marciume molle, cancri e galle

*Ralstonia*, agente di avvizzimenti vascolari in solanaceae

*Rhizobacter*, agente di galle nelle carote

*Rhizomonas*, agente di marciume nelle radici delle lattughe

*Xanthomonas*, agente di maculature fogliari e sui frutti, in piante perenni ed annuali, appassimento vascolare, cancro negli agrumi.

*Xylophilus*, agente del cancro batterico della vite e necrosi

Famiglia: Rhizobiaceae

Genere: *Agrobacterium*, agenti causali di tumore batterico

*Rhizobium*, agente di noduli radicali nelle leguminose

Famiglia: ancora senza nome

Genere: *Xylella*, batterio dello xilema, causa deperimento di alberi e vite

*Candidatus Liberibacter*, batterio floematico, agenti dell'Huanglongbing degli agrumi

Divisione: Firmicutes — Batteri Gram-positivi

Classe: Firmibacteria — Batteri unicellulari

Genere: *Bacillus*, agenti di marciume nei tuberi, striature bianche in semi e piantine di grano

*Clostridium*, agenti di marciume di tuberi e foglie, e scolorimento giallo-marrone nel nucleo centrale del legno in piante di pioppo e olmo

Classe: Thallobacteria — Branching bacteria

Genere: *Arthrobacter*, agente ruggine batterica negli agrifogli

*Clavibacter*, agenti di appassimento in erba medica, patata e pomodoro

*Curtobacterium*, agenti di avvizzimento in frumento e altre colture

*Leifsonia*, agente dell'arresto della crescita nella canna da zucchero

*Rhodococcus*, agente di fasciazioni nel pisello odoroso e altre specie

*Streptomyces*, agente della scabbia comune sulla patata

**Mollicutes — hanno solo membrana cellulare mentre è assente la parete cellulare**

Divisione: Tenericutes

Classe: Mollicutes

Famiglia: Spiroplasmataceae

Genere: *Spiroplasma*, agenti del nanismo nel mais

Famiglia(famiglie): ancora sconosciute

Genere: *Phytoplasma*, agenti di ingiallimenti, proliferazioni e deperimento in alberi e piante annuali.

## 7. CARATTERISTICHE GENERALI DEI BATTERI FITOPATOGENI

I batteri sono procarioti unicellulari, mancanti di nucleo, cloroplasti, mitocondri, vacuoli e di reticolo endoplasmatico. Si riproducono per schizogonia. Sono dotati di una membrana cellulare che è circondata da una parete cellulare; a volte è presente un ulteriore involucro, la capsula, costituito da zuccheri (presente in alcuni batteri patogeni). La presenza della parete distingue i batteri dai fitoplasmii, altra classe di procarioti.

Nel citoplasma della cellula batterica troviamo: macromolecole avente funzioni enzimatiche o di supporto, i ribosomi e il materiale nucleare (nucleoide) contenente DNA e proteine. Hanno i caratteri ereditari codificati nel cromosoma o in plasmidi eventualmente presenti, circa 10-100 volte più piccoli rispetto al cromosoma. Entrambi sono molecole anulari di DNA a doppia catena, non racchiusi da membrane. Al cromosoma sono associate proteine che distinguono domini genomici.

I batteri fitopatogeni sono eterotrofi, a forma di bastoncello, misuranti 0,6-3,5  $\mu\text{m}$  di lunghezza e 0,5-1  $\mu\text{m}$  di larghezza. In ambiente naturale si presentano singoli o aggregati in corte catenelle o in gruppi caratteristici (es. a stella, ad Y, a V). Quelli mobili nuotano in mezzo liquido (condizione ambientale necessaria alla sopravvivenza ed azione di tali patogeni) per mezzo di lunghi filamenti, detti flagelli, inseriti ad una estremità (polari) o tutto attorno alla parete (peritrichi). L'intervallo termico ottimale di crescita è compreso tra 25 e 30°C (psicrofili) e non sempre corrisponde a quello ottimale per causare malattia. Per moltiplicarsi necessitano di adeguata nutrizione minerale ed organica, che in natura trovano vivendo in associazione con le piante nella rizosfera, nella fillosfera o al loro interno. In laboratorio possono essere coltivati su appropriati mezzi nutritivi, solidi o liquidi. A partire dal 1972 sono state scoperte una minoranza di specie, detti batteri fastidiosi, questi possiedono delle esigenze nutrizionali speciali e il loro crescita in laboratorio è molto difficile (es. *Xylella*) o nel caso del *Phlomobacter* impossibile.

Fin dall'ottocento sono note malattie delle piante causate da batteri. Tra il 1886 e il 1889, fu Savastano, il primo italiano, a dimostrare l'eziologia batterica della rogna dell'olivo, una malattia molto comune che interessa le coltivazioni di olivo. Pur essendo segnalate in Italia su numerose piante agrarie, occasionalmente anche in forma epidemica, le batteriosi condizionano la produzione di poche colture erbacee (es. fagiolo, garofano, patata, pomodoro, sedano) ed arboree (actinidia, drupacee, nocciolo, olivo, pomacee, vite), sia in pieno campo che in ambiente controllato. E' oggi presente il rischio di introdurre alcune batteriosi (es. huanglongbing degli agrumi, malattia di Pierce della vite) potenzialmente capaci di arrecare gravi danni a colture economicamente molto importanti. Negli anni novanta del secolo scorso sono comparse in Italia malattie quali il colpo di fuoco delle pomacee e il marciume bruno della patata; mentre il colpo di fuoco si va tuttora diffondendo, del marciume bruno non c'è stata apparentemente diffusione almeno nelle colture industriali. Le

batteriosi rivestono importanza, per i danni economici che determinano, per le produzioni vivaistiche, sementiere e micropropagative (Agrios, 2005).

## 7.1 Patogenesi

I batteri fitopatogeni associati alle piante, possono essere epifiti o endofiti. Allo stato epifita vivono nel film liquido dove si accumulano gli essudati delle piante, nella rizosfera e nella fillosfera. Allo stato endofita colonizzano gli spazi intercellulari dei tessuti e/o gli elementi conduttori (tracheidi e vasi) dello xilema (habitat apoplastico). Una minoranza risiede nei tubi cribrosi del floema (habitat simplastico). Di regola, la patogenicità è espressa solo allo stato endofita; lo stato epifita è noto solo per una parte di essi.

I batteri non sono in grado di superare attivamente, attraverso azione meccanica o enzimatica, le pareti cutinizzate, suberificate e/o lignificate dei tessuti tegumentali. Il passaggio ad endofiti è passivo ed ha luogo in punti dove le barriere sono interrotte naturalmente (stomi, idatodi, lenticelle, stigmi, nettarii, peli e tricomi) od occasionalmente interrotte in corrispondenza di microscopiche, come quelle dovute alla rottura di cellule ghiandolifere o di peli e tricomi, oppure macroferite di qualsiasi natura. Il processo di penetrazione ha luogo di norma in condizioni di bagnatura delle sedi e, per stomi ed idatodi, è associata ad uno stato di congestione idrica dei tessuti. La congestione ha luogo quando a cellule vegetali turgide c'è eccesso di acqua nelle pareti e nello xilema in modo che le camere ipostomatiche si riempiano di liquido e negli idatodi si creino condizioni per la guttazione. L'evento avviene di regola durante la stagione vegetativa con terreno caldo e umido alle prime luci dell'alba in presenza di rugiada.

Poche ore dopo la penetrazione, i batteri iniziano a moltiplicarsi ed a colonizzare i tessuti solo se hanno la capacità di prevenire, evitare o superare le reazioni di difesa messe in atto dalla pianta. Le prime 2-3 ore sono critiche per il successo delle infezioni. Questa fase è funzione della capacità della cellula batterica di riconoscere, mediante interazione specifica, la pianta ospite adatta. In queste circostanze, il riconoscimento di un batterio dannoso da parte della pianta non avviene o, se avviene, le contromisure di difesa non sono in grado di arrestarne l'invasione (reazione compatibile).

Penetrati ed entrati in contatto con le pareti delle cellule vegetali, i batteri virulenti hanno la capacità di produrre sistemi di secrezione che liberano nell'ambiente o addirittura iniettano fattori di virulenza entro le cellule della pianta ospite. I fattori di virulenza interferiscono, ostacolano o distruggono i sistemi di segnalazione posseduti dalle cellule vegetali per mettere in atto le barriere di difesa.

Divenuti endofiti possono avere attitudini biotrofiche o necrotrofiche; quelli biotrofici riescono a convivere temporaneamente con le cellule vegetali senza arrecare danni irreversibili, si nutrono di soluti apoplastici resi disponibili dalle

cellule vegetali sotto l'effetto dei fattori di virulenza; quelli necrotrofici, invece, uccidono a distanza (qualche decina di  $\mu\text{m}$ ) le cellule vegetali servendosi di propri enzimi degradativi extracellulari e si nutrono di soluti resi liberi dalla degradazione dei polimeri delle pareti vegetali e/o dalle cellule moribonde.

La morte ipersensitiva delle cellule vegetali, alla cui parete si sono attaccati batteri, è la reazione battericida più rapida, bloccante i batteri biotrofici negli stessi punti di penetrazione. La progressiva infezione dei tessuti porta alla comparsa di sintomi, correlati per qualità ed evoluzione al tipo di habitat endofita.

Batteri a prevalente habitat intercellulare sono agenti di maculature, macchiettature e marciumi molli in foglie, frutti, tuberi e bulbi, di cancri nei tessuti corticali degli alberi.

Batteri a prevalente habitat xilematico sono agenti di appassimenti e di avvizzimenti, ed anche di cancri in piante erbacee. Per gli agenti di iperplasie (tumori, galle) prevale l'habitat intercellulare. Di regola, però, ogni batterio fitopatogeno può avere entrambi gli habitat. Gli spostamenti endofiti a distanza dalle lesioni primarie hanno luogo di norma per via xilematica. Il passaggio tra due elementi xilematici successivi avviene attraverso punteggiature, per distruzione meccanica o enzimatica dei tramezzi.

Il periodo di incubazione delle batteriosi è variabile da un minimo di due giorni per i marciumi molli, a circa 3-7 giorni per le maculature delle foglie e dei frutti, a 15-20 giorni per le galle ed i tumori, sino ad un massimo di 6 mesi e ad oltre un anno per certe infezioni vascolari. Le maculature fogliari, dette maculature angolari, osservate in fase iniziale, sono il sintomo di maggior valore diagnostico per la loro peculiarità: aree di 2-4 mm di diametro, di color verde oliva, idropiche (il tessuto pare pieno d'acqua), a bordo poligonale, contornate dalle nervature più piccole.

Le reazioni post-infezionali in grado di contenere o arrestare la colonizzazione sia dei biotrofici sia dei necrotrofici, consistono per lo più nell'attuazione di barriere di suberina e/o di lignina associate alle pareti nei tessuti parenchimatici, cementazione delle punteggiature, versamenti di gomme e tillosi negli elementi xilematici. I batteri possono evadere dai tessuti infetti sotto forma di essudato, criptico o palese, costituito da milioni di cellule confettate in polisaccaridi idrofili da essi stessi prodotti. L'essudato criptico forma una sottile pellicola superficiale e si rende visibile per l'aspetto untuoso o lucente dell'area infettata. L'essudato palese è visibile sotto forma di goccioline lattiginose o giallastre. Certi batteri non hanno mai evasione sotto forma di essudato e la loro fuoriuscita dalla pianta ospite è passiva a seguito di degradazione dei residui della vegetazione infetta o per azione di fitofagi.

## 7.2 Epidemiologia

Le batteriosi sono malattie infettive aventi sorgenti di inoculo primarie e secondarie. Le sorgenti primarie danno origine ai batteri causanti la prima infezione

all'inizio del periodo vegetativo, quelle secondarie ai batteri responsabili delle infezioni successive. Le sorgenti primarie più comuni sono i residui della vegetazione infetta, semente ed organi di propagazione vegetativa per le piante erbacee, gemme, marze, talee, barbatelle, portainnesti e cancri corticali per gli alberi. Semi ed organi di propagazione vegetativa spesso ospitano batteri in modo asintomatico. L'efficacia dei residui della vegetazione infetta come sorgente di inoculo, solitamente non va oltre la completa decomposizione ad opera della microflora terricola. Residui lignificati, pertanto, sono sorgenti più durevoli rispetto a quelli erbacei. Nei semi, i batteri possono essere contaminanti superficiali oppure essere interni infettando più frequentemente il tegumento, i cotiledoni, l'endosperma ed eccezionalmente l'embrione; in certi casi possono essere associati alla materia inerte della semente come residui di pianta madre o particelle di terreno mescolate ai semi durante la trebbiatura. I batteri seminali, comunque, sono in stato di ipobiosi, meno sensibili ai trattamenti termici ed alla disidratazione. Nei tuberi, nei bulbi, nelle talee, nelle marze e nelle barbatelle, i batteri risiedono abitualmente entro lo xilema dei tessuti vascolari.

Nelle gemme i batteri si localizzano tra le perule e/o nel parenchima sotto la cicatrice di caduta delle foglie; nei cancri corticali ibernanti di tronchi e branche possono sopravvivere al margine in qualche areola di tessuto infetto.

Sorgenti secondarie di inoculo sono gli stessi organi infettati nel corso del periodo vegetativo. Dalle sorgenti di inoculo i batteri sono disseminati da vettori abiotici e biotici. Agenti di disseminazione più comuni sono acqua, vento, insetti, nematodi, uccelli e uomo.

Le gocce d'acqua colpendo le sorgenti di inoculo si frangono, sospendono i batteri disponibili e generano aerosol infettivi liquidi. Le minuscole goccioline di sospensione possono schizzare direttamente fino a circa 1-2 metri od essere trasportate dal vento su organi della stessa pianta, di piante attigue o di piante site ad una distanza non superiore a 500-1000 metri. Il vento può disseminare anche aerosol infettivi solidi generati in colture infette nel corso della trebbiatura o di altre operazioni colturali polverizzanti tessuti infetti oppure dalla frammentazione delle crosticine generatesi su organi infetti a seguito del disseccamento delle goccioline evase di essudato.

Gli insetti contraggono rapporti di trasmissione assimilabili più spesso al tipo virale non persistente. Si contamina l'apparato boccale o gli arti o altre appendici nutrendosi su una pianta malata, e poi trasportano i batteri su una pianta sana. In pochi casi la trasmissione è assimilabile al tipo propagativo. *Chaetocnema pulicaria*, l'altica del mais, può albergare vitale nel proprio intestino *E. stewartii* per tutto l'inverno e trasmetterlo alle giovani piante di mais alla prima infestazione della primavera seguente. Analoga trasmissione ha *E. tracheiphila*, agente dell'avvizzimento delle cucurbitacee, per mezzo dei coleotteri *Acalymma vittata* e *Diabrotica undecempunctata*, di cui alberga l'intestino dove sverna. *Xylella fastidiosa* può essere acquisita da cicadellidi su numerose piante erbacee ed essere

trasmessa alla vite o ad alberi. La trasmissione ha successo immediatamente dopo l'acquisizione e perdura per tutta la vita dell'insetto; in quei cicadellidi *X. fastidiosa* si moltiplica attaccata alla superficie del tratto iniziale del tubo digerente dove forma tappeti di proprie cellule disposte a palizzata. C'è chi ritiene verosimile che merli, storni e tordi nel corso delle loro migrazioni possano disseminare *E. amylovora* nutrendosi di frutti di biancospini infetti e posandosi poi sui peri ed altre piante ospiti. Infine, l'uomo può fungere da vettore a breve distanza, sporcando di batteri mani ed attrezzi, ed a grande distanza con il commercio di semi, organi di propagazione vegetativa, portainnesti e astoni.

### **7.3 *Rhodococcus fascians* (Tilford) Goodfellow**

Tra i batteri fitopatogeni noti, la specie correlata a manifestazioni di forma, quali fasciazioni o proliferazioni di gemme, è il batterio gram-positivo *Rhodococcus fascians* (Tilford) Goodfellow, agente causale di persistenti problemi nel settore delle piante ornamentali erbacee perenni. Noto come *Corynebacterium fascians* fino al 1984, fu posto da Goodfellow nel nuovo genere *Rhodococcus* in seguito a studi di tassonomia numerica.

Il genere *Rhodococcus* comprende batteri gram-positivi, che sono strettamente connessi con i *Mycobacteria* ed i *Corynebacteria*; il genere è stato posto nell'ordine Actinomycetales, sottordine Corynebacterineae, appartenente alla famiglia Nocardiaceae (Gürtler et al., 2004). *R. fascians*, l'unico fitopatogeno nel genere *Rhodococcus*, è un batterio aerobico, pleiomorfico, non mobile e che non forma spore, la parete cellulare contiene acidi micolici (Holt et al., 1994), le cellule sono nocardioformi, nel senso che possono avere la crescita del micelio con la frammentazione in forma di bastoncino o coccoide (Bell et al., 1998). Le sue colonie sono di piccole dimensioni, rotonde, intere, convesse, opache, le colonie che inizialmente appaiono color crema dopo 7 giorni diventano arancioni scintillanti e possono essere lisce o non.

#### **7.3.1 Sintomatologia**

Spesso i sintomi causati da *R. fascians* sono confusi con gli effetti causati dall'impiego errato di ormoni vegetali. Agricoltori che non riconoscono le loro piante come malate, rischiano così di propagare il batterio con i loro tagli. La complicazione della malattia è dovuta alla capacità del batterio di persistere sulla superficie delle piante come epifita per molti mesi prima che si manifestino i sintomi (Lacey, 1939).

L'infezione delle piante da parte di *R. fascians* porta allo sviluppo di alcuni sintomi tipici, tra cui deformazione delle foglie, fasciazioni, scopazzi, galle fogliari, produzione abnorme di germogli, arresto della crescita, radici avventizie e in alcuni

casi inibizione della crescita delle radici. Lo sviluppo dei sintomi dipende dalla cultivar della pianta (Baker, 1950; Jacobs e Mohanty, 1951; Lacey 1936a, 1936b, 1939; Muncie e Patel 1930), dall'età della pianta al momento dell'infezione (Lacey 1936a, 1942), dal ceppo batterico (Eason *et al.*, 1995; Goethals *et al.*, 2001; Jacobs e Mohanty, 1951; Miller *et al.*, 1980) e dalle condizioni di crescita del batterio stesso (Lacey 1936a). La deformazione delle foglie è determinata da un'espansione del parenchima e dalla crescita del sistema vascolare, che sono alla base del corrugamento della lamina e dell'allargamento delle venature. La fasciazione si manifesta come espansione degli steli in due dimensioni, che si sviluppano con una crescita nastriforme. Gli scopazzi sono un'alterazione della crescita, che consiste in un aumento del numero delle ramificazioni primarie e secondarie, foglie deformate o abbozzate per il blocco dello sviluppo della gemma apicale ed risveglio di gemme secondarie dormienti.

Il batterio è ampiamente diffuso ed è stato segnalato in almeno 19 stati degli Stati Uniti, in Messico, Canada, Nord Europa, Medio Oriente, Asia, Australia e Nuova Zelanda, nel continente africano è stato segnalato in Egitto, in Sud America in Colombia.

La gamma di piante sensibili è altrettanto numerosa, infatti è patogeno sia di angiosperme che gimnosperme. Molto spesso, però, vengono riportati dati che si basano solo sulla presenza dei sintomi, senza quindi isolamento e ancora meno senza soddisfare i postulati di Koch. Storicamente, la patogenicità dei batteri recuperati dalla galle fogliari è stata confermata inoculando l'agente causale su un ospite indicatore, a tale scopo solitamente viene utilizzato il pisello odoroso (Lacey, 1936a; Tilford, 1936), per la facilità di infezione e velocità di sviluppo dei sintomi (5-7 giorni).

### 7.3.2 Patogenesi

Tutti gli effetti dell'infezione di *R. fascians* non derivano da una trasformazione delle cellule vegetali da parte del batterio (come nel caso di *Agrobacterium tumefaciens* o *Agrobacterium rhizogenes*), ma dagli effetti dell'espressione di geni per la virulenza del batterio e dalla produzione, da parte del batterio stesso, di composti in grado d'interferire con la crescita e lo sviluppo della pianta (sostanze ormonosimili). Il batterio durante l'infezione tende a restare all'esterno dei tessuti vegetali, solitamente in prossimità di cavità o giunture della parete cellulare delle cellule vegetali. In alcuni casi si è osservata la presenza di batteri negli spazi intercellulari all'interno di tessuti (all'interno di foglie o galle) e, più raramente, all'interno della parete cellulare. La presenza del batterio sulla pianta è necessaria non solo per l'inizio dell'infezione ma anche per il mantenimento della stessa.

La virulenza di *R. fascians* è controllata da una serie di geni presenti su un plasmide di 200 Kb (Crespi *et al.* 1992, 1994; Pisabarro *et al.*, 1998) che porta

almeno tre loci (*fas*, *att* e *hyp*) per la patogenicità (Crespi *et al.* 1992; Vereecke *et al.*, 2003); i ceppi mancanti di plasmide non sono virulenti.

Il locus *fas* è un operone composto da sei geni (Orf 1-6) e un gene regolatore, *fasR* che regola la trascrizione dell'operone. Delezioni di alcuni dei geni dell'operone portano a perdita di virulenza, lasciando pensare che *fas* abbia un ruolo centrale per l'infezione (Crespi *et al.*, 1992, 1994; Vereecke *et al.*, 2002). Mentre i loci *att* e *hyp* regolano la gravità dei sintomi (Cornelis *et al.*, 2002; Crespi *et al.*, 1992). Un quarto locus coinvolto nella patogenicità è il locus *vic* che è stato identificato grazie ad una mutazione sul cromosoma batterico in grado di attenuare la virulenza. Il gene individuato è *vicA* e la trascrizione di questo gene è indotta da piruvato e gliossilato. Il gene codifica per una proteina omologa a Mas, presente in altri batteri e necessaria per il passaggio dal ciclo di Krebs al ciclo del gliossilato, probabilmente sia per esigenze metaboliche del batterio che per evitare l'accumulo di gliossilato, altrimenti tossico per il batterio. L'attenuazione della virulenza data da mutazioni in *vicA* è data proprio dall'incapacità del batterio di resistere all'accumulo di gliossilato (Vereecke *et al.*, 2002).

I sintomi dell'infezione di *R. fascians* sono riconducibili a effetti di iperdosaggio di ormoni vegetali. In particolare si notano effetti normalmente dovuti a citochinine, come la formazione di "isole verdi" sulle foglie, il corrugamento delle lamine fogliari, la proliferazione di germogli, il ritardo della senescenza e l'inibizione di radici laterali, ed effetti dovuti ad auxine, come la distensione cellulare, differenziazione di tessuti vascolari e di radici laterali (Eason *et al.*, 1996; Vereecke *et al.*, 2002).

*R. fascians* risiede principalmente sulla parete esterna della pianta. Cornelis e collaboratori (2001) per verificare le prime osservazioni effettuate da Lacey (1936) ha usato la microscopia elettronica a scansione e l'ibridazione in situ. A differenza di molti altri batteri fitopatogeni, sia gli stomi che gli idatodi non sono importanti per l'ingresso dei batteri. Il batterio non è limitato negli spazi intracellulari e sono state osservate cellule batteriche circondate da una singola parete cellulare, indicando così una penetrazione intracellulare. Questi batteri sono stati isolati più spesso all'esterno delle piante (come epifita) piuttosto che all'interno, anche se alcune volte sono stati osservati all'interno dei tessuti vascolari di tabacco o di *Arabidopsis* (Cornelis *et al.*, 2001). *R. fascians* non si può considerare sistemico nelle piante (Goethals *et al.* 2001; Lacey 1936a, 1936b; Vereecke *et al.*, 2000).

Sempre secondo Cornelis e collaboratori (2001), il modello di infezione di *R. fascians* è il seguente: il batterio cresce sulla superficie aerea della pianta, protetto da uno strato di mucillagine batterica, quindi causa un collasso di alcune cellule epidermiche e penetra nella pianta. I batteri superficiali producono un segnale o segnali che avviano lo sviluppo dei sintomi compresa la generazione di nuovo meristema, o l'attivazione di meristemi esistenti, con conseguente produzione di galle fogliari.

### 7.3.3 Diagnosi e rilevamento del patogeno

La diagnosi di *R. fascians* è complicata dalla somiglianza dei sintomi con quelli che vengono indotti dall'uso di ormoni sintetici nella produzione delle piante. La diagnosi deve essere confermata, con l'isolamento e l'inoculazione di *R. fascians* ad un ospite suscettibile. L'isolamento è particolarmente difficoltoso ed è per questo che molti metodi sono stati pubblicati (Bradburry, 1967; Lacey, 1936a; Miller *et al.*, 1980; Shaad, 2001; Takayama *et al.*, 1985; Tilford, 1936; Ulrychová e Petru, 1983).

E' importante confermare la patogenicità di un isolato batterico come *R. fascians*, dal momento che ceppi virulenti possono essere recuperati da piante (Ulrychová, & Petrů, 1983), anche su quelle asintomatiche (Lacey, 1955).

I metodi utilizzati per identificare e rilevare la presenza di *R. fascians*, dopo isolamento di colonie sospette, comprendono test biochimici e fisiologici classici, utilizzo di fonti di carbonio (Biolog, Hayward, CA; BioMérieux, Durham, NC), analisi degli acidi grassi, ibridazione del DNA utile per distinguere il *R. fascians* da altri batteri corineformi (Hu *et al.*, 1992), metodi sierologici e reazione a catena della polimerasi (Stange *et al.*, 1996). Ciascuna procedura ha degli inconvenienti, e gli isolati possono accidentalmente essere esclusi a causa della variabilità tra i ceppi.

*Tecniche di isolamento* - Trattandosi di un batterio di "superficie", nel trattamento mediante esposizione alla fiamma o con disinfettanti chimici del materiale vegetale da cui effettuare l'isolamento, si riduce notevolmente il numero di batteri vitali (Lacey, 1936). Per tale motivo i metodi tradizionali di disinfezione dei tessuti non possono essere utilizzati creando un ostacolo all'isolamento di questo batterio per la facilità di contaminazione da parte di altri epifiti a crescita più rapida ed a esigenze nutritive e termiche inferiori. Inoltre, la crescita di *R. fascians* su substrato artificiale è particolarmente lenta (a 27°C) rispetto ad altri batteri. Le colonie ottenute devono mostrare una colorazione arancio salmone brillante. Sono stati descritti anche mutanti bianchi (Cornelis *et al.*, 2001; Jacobs e Mohanty, 1951) generati anche per irraggiamento (Jacobs *et al.*, 1965). Considerato che nessuno dei mutanti irradiati ha perso virulenza, la produzione del pigmento è considerata non associata alla capacità di determinare malattia sulle piante infette (Jacobs *et al.*, 1965).

*Identificazione* - Una volta isolata la coltura batterica di *R. fascians* da piante sintomatiche, la conferma dell'identità può essere problematica poiché è difficile distinguere *Rhodococcus* da altri corinebatteri non patogeni e identificare le specie attraverso i soli caratteri fenotipici (Bizet *et al.*, 1997; Valdés-Stauber *et al.*, 1997).

La differenziazione di *R. fascians* da altri corinebatteri è stata descritta da Shaad e collaboratori (2001) e Hu e collaboratori (1992). Tra le tecniche di identificazione sono il profilo degli acidi grassi cellulari e il profilo metabolico mediante il BIOLOG, un sistema che permette l'identificazione delle specie microbiche attraverso la definizione del profilo nutrizionale.

Per una più rapida identificazione è, inoltre, possibile ricorrere all'impiego della PCR con primer universali che amplificano una regione conservata del gene 16S, e dopo sequenziamento del frammento subgenomico è possibile confrontare la sequenza con quelle depositate in banche dati genomiche.

## 8. I FITOPLASMI

Le fitoplasmosi sono le malattie causate dai fitoplasmi. La scoperta dei fitoplasmi risale alla fine degli anni '60, quando sono stati osservati microrganismi che colonizzavano il floema delle piante e che erano associati a sintomatologie più o meno specifiche: per la loro somiglianza con i micoplasmi, vennero chiamati Mycoplasma Like Organisms o MLO. I micoplasmi sono parassiti dell'uomo o degli animali di diverse specie ampiamente distribuiti nell'ambiente. Sono noti come agenti di malattie degli animali dalla fine del secolo scorso e come possibili patogeni dell'uomo da circa trent'anni.

La scoperta di forme patogene per le piante è molto più recente ed è dovuta a Doi e collaboratori (1967) ed Ishiie e collaboratori (1967). Questa scoperta, insieme a quella dei viroidi (Diener, 1971), rappresenta un vero e proprio 'salto epistemologico' nella storia della patologia vegetale degli ultimi cinquant'anni, perché fino a questo momento si riteneva che agenti di malattie infettive delle piante fossero solo funghi, batteri e virus. I ricercatori giapponesi (Doi *et al.*, 1967; Ishiie *et al.*, 1967) avvalendosi delle conoscenze note per i micoplasmi parassiti dei vertebrati, studiarono con metodi nuovi un gruppo di malattie (giallumi "yellows", virescenze "stolbur", scopazzi "witches' broom") che per la tipologia di sintomi indotti e per le modalità di trasmissione, erano in precedenza state considerate malattie da virus. Venne supposto che gli agenti eziologici delle malattie menzionate potevano essere o micoplasmi o clamidie. Numerose ricerche condotte da Casper (1969), Bos (1970), Maramorosch e collaboratori (1970), Whitcomb e Davis (1970) rafforzarono l'ipotesi a favore dei micoplasmi.

Gli studi successivi evidenziarono numerose differenze tra i micoplasmi e gli MLO (fra cui la localizzazione extracellulare dei micoplasmi al contrario di quella degli MLO) e nel 1994 venne proposta la nuova denominazione di fitoplasmi (Murray e Shleifer, 1994; Sears e Kirkpatrick, 1994) e creato il *taxon* Phytoplasma, all'interno della classe *Mollicutes* (Agrios, 1997; Fletcher *et al.*, 1998).

Kirkpatrick e Sears, durante l'International Committeè of Systematic Bacteriology (ICSB) Subcommittee Mollicutes, proposero nel 1993 i criteri specifici che devono essere soddisfatti per includere i microrganismi fra i fitoplasmi:

- la microscopia elettronica a trasmissione deve evidenziare procarioti pleomorfici privi di parete all'interno di tessuti vegetali;
- gli organismi devono essere rinvenuti nei tubi cribrosi del floema e in generale devono essere associati con malattie che causano sintomi di deperimento, giallumi

e/o anomalie di sviluppo, particolarmente dei fiori;

- i microrganismi sono trasmessi da cicaline, cixiidi o psille che si alimentano nel floema (flaemomizi);

- i microrganismi sono resistenti alla penicillina ma altamente sensibili alle tetracicline;

- il genoma di questi microrganismi è di piccole dimensioni (530-1350 kbp) e il contenuto di G (guanina) + C (citosina) è basso (23-29 mol % sul totale delle basi);

- le analisi delle sequenze dovrebbero indicare che l'organismo è filogeneticamente correlato ad altri *Mollicutes*.

Per risolvere gli impedimenti legati alla possibilità di adattare microrganismi non coltivabili *in vitro* agli usuali criteri di tassonomia dei procarioti, nel 2004 il Gruppo Tassonomia dei Fitoplasmi in accordo con il sottocomitato per l'atassonomia dei Mollicutes del Comitato Internazionale di Sistematica dei Batteri ha proposto di creare un taxon provvisorio di "*Candidatus Phytoplasma*" allo scopo di classificare i mollicuti non-elicotidali patogeni delle piante (IRPCM, 2004).

Fu, quindi, evidenziata l'esistenza di microrganismi procarioti fitopatogeni fino allora sconosciuti ed aperto un nuovo campo della patologia vegetale destinato ad acquisire sempre maggiore interesse scientifico ed applicato. Viste le caratteristiche di tali malattie e patogeni, lo studio della malattie da fitoplasmi è da sempre stato di competenza dei virologi vegetali nonostante il loro inquadramento nei procarioti.

I Postulati di Koch, non sono stati ancor oggi soddisfatti per alcuna fitoplasmosi dei vegetali dato che, nonostante ripetuti tentativi condotti nei laboratori, non si è ancora riusciti a coltivare alcun fitoplasma su substrati artificiali per poi procedere all'assolvimento dei suddetti postulati tramite inoculazione artificiale su specifiche piante ospiti e successivo reisolamento da queste, dopo la comparsa dei sintomi tipici della malattia. La ricerca, quindi, benché condotta con continuità da oltre trent'anni non è stata in grado di mettere a punto tecniche idonee per coltivare i fitoplasmi *in vitro* a causa delle difficoltà legate alla ricostituzione di fluidi uguali al liquido floematico.

Conseguentemente risulta difficile la caratterizzazione e classificazione di questi microrganismi. I ricercatori, nel tentativo di caratterizzare le specie si sono avvalsi di molti strumenti (microscopio elettronico, microscopio a contrasto di fase), di tecniche sierologiche e di biologia molecolare (elettroforesi, reazioni sierologiche, ingegneria genetica) e di studi in pieno campo (epidemiologia, analisi dei sintomi, risposta delle piante alla somministrazione di antibiotici, individuazione del range di ospiti).

## 8.1 Caratteristiche generali

I fitoplasmi sono microrganismi unicellulari, procarioti che si differenziano dai tipici batteri per l'assenza di parete cellulare e per possedere un genoma di

dimensioni nettamente inferiori variante fra 530 e i 1350 kbp; misurano 200-800 nm; possiedono citoplasma, ribosomi e filamenti di DNA nel nucleo; si moltiplicano per gemmazione cellulare e divisione binaria.

I fitoplasmi consistono in cellule per lo più rotondeggianti ma tendenzialmente pleomorfa di forma irregolare, con un diametro di circa 0,2-0,5  $\mu\text{m}$  e quindi molto più piccoli delle tipiche cellule batteriche (circa 1,0-2,0  $\mu\text{m}$ ). A differenza dei virus, i fitoplasmi possiedono un proprio metabolismo, che tuttavia è assai ridotto, a tal punto che molte molecole vitali, indispensabili per la loro sussistenza, devono essere acquisite da cellule dell'ospite (rapporto di parassitismo biotrofico obbligato).

Come tutti i batteri, i fitoplasmi sono delimitati da una membrana a tre strati (spessore 0,75-10 nm) spesso asimmetrica, ma, come detto, hanno la peculiare caratteristica di non essere dotati di una parete cellulare rigida. Secondo studi recenti essi sono il risultato di un'evoluzione regressiva dei batteri Gram-positivi quali quelli dei generi *Bacillus* e di *Clostridium*, che ha comportato una riduzione del genoma e la perdita della capacità di sintetizzare la parete cellulare. Ne consegue che essi sono pleomorfi, non hanno in pratica una forma stabile e definita. In sezioni ultrasottili di cellule infette si può riscontrare al microscopio elettronico fitoplasmi di forma rotondeggiante (diametro 60-100 nm), forme globose più grandi (diametro 150-1100 nm) o particelle filamentose ramificate (con lunghezza da 1-2 nm a molti nm).

Si possono sviluppare esclusivamente su tessuto vivo d'un ospite; non sono coltivabili *in vitro* ma sono patogeni obbligati risidenti nei tubi cribrosi e negli insetti vettori che, nutrendosi su piante infette, acquisiscono la capacità di trasmettere il fitoplasma (Bertaccini, 2002). Nella pianta, i fitoplasmi si sviluppano esclusivamente nelle cellule del floema e, seconda del punto di infezione, raggiungono le parti di pianta interessate dalla porzione di floema in cui è avvenuta l'infezione. A seconda del punto di penetrazione e della fase fenologica della pianta i fitoplasmi sono patogeni sistemici generalizzati o settoriali. Solo occasionalmente essi sono stati rinvenuti nel parenchima o nelle cellule compagne del floema ed in alcuni casi nei tessuti del parenchima corticale. In genere sono più concentrati e distribuiti uniformemente nelle piante erbacee che non nelle arboree. In virtù delle piccole dimensioni e del pleomorfismo, i fitoplasmi passano da cellula a cellula attraverso i pori delle placche cribrose. Sono infeudati al floema, e svernano di norma nell'apparato radicale (Ploaie, 1981).

I fitoplasmi sono associati a più di settecento malattie che colpiscono un gran numero di piante orticole, frutticole, ornamentali, arboree spontanee e coltivate (McCoy et al., 1989; Kirkpatrick, 1992). I sintomi che inducono sulle piante ospiti, sono correlati all'alterazione delle capacità di conduzione dei vasi floematici ed a squilibri ormonali, che provocano malformazioni e anomalie durante lo sviluppo vegetativo (Belli e Bianco, 2005).

## 8.2 Classificazione dei fitoplasmi

La caratterizzazione e la classificazione dei fitoplasmi risulta difficile poiché non sono coltivabili su substrato artificiale. I criteri di classificazione applicati per i batteri non possono essere, quindi, applicati. Fino alla fine degli anni '90 essi sono stati classificati in base alle caratteristiche biologiche (sintomi indotti sull'ospite, serie delle piante ospiti, correlazioni con gli insetti vettori, e talvolta in base all'area geografica) e denominati di conseguenza. Tra gli esempi l'American Aster Yellows (AAY) corrispondente all'isolato associato al giallume americano dell'astro, l'European Aster Yellows (EAY) al giallume europeo dell'astro, il Bermuda Grass White Leaf (BGWL) allo sbiancamento della foglia di gramigna. Solo in seguito, con la messa a punto di tecniche di biologia molecolare, è stato possibile differenziare, caratterizzare e classificare questi microrganismi su base filogenetica (Kirkpatrick *et al.*, 1987).

Inizialmente l'uso delle sonde molecolari fitoplasma-specifiche ottenute mediante clonazione a random da estratti di piante infette, hanno consentito di distinguere tra di loro e abbozzare una prima classificazione di questi microrganismi, basata sull'individuazione di gruppi DNA-DNA specifici e, tramite all'uso di anticorpi monoclonali, di gruppi sierologici. La sensibilità di questi tipi di sonde molecolari e degli anticorpi monoclonali era insufficiente per molti fitoplasmi soprattutto se associati a piante legnose.

Un ulteriore e concreto miglioramento fu ottenuto con l'applicazione della PCR (*Polymerase Chain Reaction*) per il rilevamento e caratterizzazione del gene 16S rRNA, elemento genomico di base per la classificazione e tassonomia dei procarioti (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, <http://www.bergeys.org/>), che permette non solo di individuare i fitoplasmi a basse concentrazioni ma anche, in combinazione con la tecnica RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), di differenziarli da altri microrganismi simili e di definirne la classificazione basata su gruppi e sottogruppi definiti in base ai profili RFLP di ceppi tipo (type strains) (Lee *et al.*, 1998; Seemüller *et al.*, 1998).

Fino ad oggi sono stati identificati nel mondo oltre 800 ceppi di fitoplasmi associati ad alcune centinaia di malattie ed a numerosi insetti vettori e sono registrate in GenBank più di 1500 sequenze di 16S rRNA identificate su ospiti vegetali differenti mostrandoti sintomi ascrivibili a fitoplasmosi.

I fitoplasmi sono classificati in gruppi e sottogruppi in base alle loro correlazioni genetiche. Ad oggi sono stati sviluppati due principali metodi di classificazione dei gruppi di fitoplasmi, ampiamente citati in letteratura; entrambi gli schemi si basano sulle informazioni genetiche contenute nei geni 16S rRNA. Il primo schema di classificazione si basa sull'analisi filogenetica delle sequenze del gene 16S rRNA (Zhao *et al.*, 2010) che ha permesso di delineare 20 differenti gruppi filogenetici. Tuttavia, questo schema basato sulla filogenesi non consente di identificare

sottogruppi e resta, quindi, ancora applicata solo quello basato sull'analisi dei polimorfismi della lunghezza dei frammenti di restrizione (RFLP) del gene 16S rRNA amplificati mediante PCR.

L'analisi RFLP del gene 16S rRNA sfrutta i "siti di riconoscimento" collocati sul gene definiti da un gruppo di 17 enzimi di restrizione [*AluI*, *BamHI*, *BfaI*, *BstUI* (*ThaI*), *DraI*, *EcoRI*, *HaeIII*, *HhaI*, *HinfI*, *HpaI*, *HpaII*, *KpnI*, *Sau3AI* (*MboI*), *MseI*, *RsaI*, *SspI* e *TaqI*] ed è in grado di differenze minime nei profili, consentendo di identificare e discriminare i diversi sottogruppi all'interno di singoli gruppi di fitoplasmi.

I gruppi di fitoplasmi delineati utilizzando lo schema di classificazione basato sulle analisi PCR-RFLP sono coerenti con la filogenesi del gene 16S rRNA ma risultano ancora quelli accettati dalla comunità scientifica per la classificazione dei fitoplasmi.

Tramite RFLP tradizionali effettuati in laboratorio erano stati identificati 19 gruppi e oltre 40 sottogruppi ma, più di recente, un significativo ampliamento dello schema di classificazione è stato ottenuto attraverso l'uso delle analisi RFLP virtuali che ha consentito di identificare 30 gruppi e oltre 100 gruppi (Tab. 1) (Zhao *et al.*, 2009).

Oltre al sistema di identificazione e classificazione basati sul gene 16S rRNA sono oggi noti ed utilizzati altri geni non conservati che permettono di applicare ulteriori fattori di discriminazione negli studi genomici dei fitoplasmi: la regione spaziatrice compresa tra 16S e 23S rDNA, il fattore di allungamento *tuf*, la proteina di membrana *secA* e *secY* (subunità del sistema di traslocazione Sec), i geni *rpS3*, *Amp* e altri (Smart *et al.*, 1996a; Schneider *et al.*, 1997a; Martini *et al.*, 2002, 2007; Lee *et al.*, 1994, 2004a, b, 2006a). La combinazione delle analisi RFLP del 16S rRNA e dei geni meno conservati che codificano per le proteine ribosomiali si è rilevata uno strumento utile per una più fine differenziazione di ceppi di fitoplasmi appartenenti allo stesso gruppo: i sottogruppi riconosciuti tramite questo metodo corrispondono ai cluster precedentemente identificati analizzando i genomi con ibridazione Dot- e Southern-Blot (Lee *et al.*, 1992, 1998; Gundersen *et al.*, 1996; Martini *et al.*, 2007).

Ogni gruppo di fitoplasmi è identificato dalla sigla 16Sr, seguita da un numero romano; se il gruppo comprende più sottogruppi si fa seguire al numero romano una lettera maiuscola (es. 16SrI-A). I gruppi sono inoltre indicati col nome della malattia a cui è stato associato il ceppo-tipo di fitoplasma (es. giallume dell'astro).

Come brevemente citato precedentemente, la definizione della categoria tassonomica provvisoria del 'Candidatus Phytoplasma' è avvenuta ufficialmente nel 2004 durante il primo convegno dell'IRPCM (International Research Programme on Comparative Mycoplasmaology) in cui fu costituito il gruppo di Tassonomia dei Fitoplasmi; questo Gruppo ha proposto che le specie di 'Candidatus (Ca.) Phytoplasma' devono essere descritte facendo riferimento ad un singolo fitoplasma corrispondente ad un'unica sequenza del gene rRNA 16S (> 1200 bp), definito come

“reference strain” e che un ceppo può essere riconosciuto come una nuova specie solo se la sequenza del suo gene 16S rRNA ha una somiglianza <97,5% rispetto alle specie ‘*Ca. Phytoplasma*’ descritte precedentemente. Ci sono tuttavia casi di fitoplasmi che pur mostrando similarità nella sequenza del gene 16S rRNA >97,5% rispetto ad un ‘*Ca. Phytoplasma*’, da esso si distinguono per caratteristiche biologiche. In tali casi possono essere descritti come specie separate solo quando le tre seguenti condizioni sono assolute: i due fitoplasmi sono trasmessi da differenti vettori; i due fitoplasmi hanno un range di piante ospiti differenti oppure il loro comportamento è significativamente differente nella stessa pianta ospite (sintomi); esiste prova di una significativa diversità dal punto di vista molecolare, ottenuta con entrambi i metodi di ibridizzazione con sonde a DNA clonate, reazione sierologica o metodo basato sulla PCR di geni conservati.

Finora sono stati proposti 33 membri di ‘*Ca. Phytoplasma*’ (IRPCM, 2004; Arocha *et al.*, 2005 2007; Schneider *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2006b; Valiunas *et al.*, 2006; Al-Saady *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2009) (Tab. 1).

A queste designazioni ufficiali pubblicate, altri sette sono già stati proposti (IRPCM, 2004) ma non sono ancora stati pubblicati ufficialmente. Questi sono ‘*Ca. P. Pruni*’, ‘*Ca. P. vitis*’, ‘*Ca. P. solani*’, ‘*Ca. P. Palmae*’, ‘*Ca. P. luffae*’, ‘*Ca. P. cocostanzianae*’ e ‘*Ca. P. cocosnigeriae*’. Questi nomi erano stati proposti durante il decimo Congresso Internazionale IOM (International Organization for Mycoplasmaology) nel 1994, ma non sono stati ancora formalmente descritti.

Tab. 1. Gruppi di fitoplasmi delineati tramite RFLP del 16S rRNA (da Zhao *et al.*, 2010)

Gruppo	N. sottogruppi	N. di specie ' <i>Ca Phytoplasma</i> '
16SrI: Aster yellows group	11	1 (' <i>Ca P. asteris</i> ')
16SrII: Peanut witches'-broom group	12	2 (' <i>Ca P. aurantifolia</i> ', ' <i>Ca. P. australasiae</i> ')
16SrIII: X-disease group	19	1 (' <i>Ca P. pruni</i> ')
16SrIV: Coconut lethal yellows group	6	1 (' <i>Ca P. palmae</i> ')
16SrV: Elm yellows group	6	3 (' <i>Ca P. ulmi</i> ', ' <i>Ca P. ziziphi</i> ', ' <i>Ca P. vitis</i> ')
16SrVI: Clover proliferation group	8	1 (' <i>Ca P. trifolii</i> ')
16SrVII: Ash yellows group	3	1 (' <i>Ca P. fraxini</i> ')
16SrVIII: Loofah witches'-broom group	1	1 (' <i>Ca P. luffae</i> ')
16SrIX: Pigeon pea witches'-broom group	4	1 (' <i>Ca P. phoenicium</i> ')
16SrX: Apple proliferation group	5	4 (' <i>Ca P. mali</i> ', ' <i>Ca P. pyri</i> ', ' <i>Ca P. prunorum</i> ', ' <i>Ca P. spartii</i> ')
16SrXI: Rice yellow dwarf group	3	1 (' <i>Ca P. oryzae</i> ')
16SrXII: Stolbur group	7	4 (' <i>Ca P. australiense</i> ', ' <i>Ca P. japonicum</i> ', ' <i>Ca P. fragariae</i> ', ' <i>Ca P. solani</i> ')
16SrXIII: Mexican periwinkle virescence group	2	1 <sup>§</sup>
16SrXIV: Bermudagrass white leaf group	1	1 (' <i>Ca P. cynodontis</i> ')
16SrXV: Hibiscus witches'-broom group	1	1 (' <i>Ca P. brasiliense</i> ')
16SrXVI: Sugarcane yellow leaf syndrome group	1	1 (' <i>Ca P. graminis</i> ')
16SrXVII: Papaya bunchy top group	1	1 (' <i>Ca P. caricae</i> ')
16SrXVIII: American potato purple top wilt group	1	1 (' <i>Ca P. americanum</i> ')
16SrXIX: Japanese chestnut witches'-broom group <sup>b</sup>	1	1 (' <i>Ca P. castaneae</i> ')
16SrXX: Buckthorn witches'-broom group	1	1 (' <i>Ca. P. rhamnii</i> ')
16SrXXI: Pine shoot proliferation group	1	1 (' <i>Ca. P. pini</i> ')
16SrXXII: Nigerian coconut lethal decline (LDN) group	1	1 (' <i>Ca. P. cocosnigeriae</i> ')
16SrXXIII: Buckland Valley grapevine yellows group	1	1 <sup>§</sup>
16SrXXIV: Sorghum bunchy shoot group	1	1 <sup>§</sup>
16SrXXV: Weeping tea tree witches' -broom group	1	1 <sup>§</sup>
16SrXXVI: Mauritius sugarcane yellows D3T1 group	1	1 <sup>§</sup>
16SrXXVII: Mauritius sugarcane yellows D3T2 group	1	1 <sup>§</sup>
16SrXXVIII: Havana derbid phytoplasma group	1	1 <sup>§</sup>
16SrXXIX: Cassia witches' -broom group <sup>d</sup>	1	1 (' <i>Ca. P. omanense</i> ')
16SrXXX: Salt cedar witches' -broom group	1	1 (' <i>Ca. P. tamaricis</i> ')

<sup>§</sup>Non sono stati proposti nomi per queste potenziali nuove specie di '*Ca. Phytoplasma*'.

### 8.3 Sintomatologia

I fitoplasmi sono parassiti obbligati e possono vivere e moltiplicarsi solo nel floema delle piante ospiti o all'interno dei vettori animali. In genere vengono colonizzate solo le cellule cribrose mentre le cellule compagne ed il parenchima circostante non sono di norma interessati. Non penetrano attivamente nelle cellule dell'ospite e di conseguenza necessitano delle punture di vettori oppure della connessione tra un tessuto infetto ed uno sano (penetrazione passiva).

Dal momento che il tropismo all'interno della pianta segue il flusso della linfa elaborata, vengono colpiti principalmente le foglie, gli organi fiorali, gli apici vegetativi e l'apparato radicale. La concentrazione dei fitoplasmi può essere diversa a seconda dell'organo interessato, della diversa suscettibilità e stadio di sviluppo della pianta ospite (Marzachi *et al.*, 2004). Sempre per il tipo di localizzazione all'interno della pianta la sintomatologia indotta è di tipo settoriale, interessando cioè solo porzioni della chioma in corrispondenza del punto di inoculazione e successiva traslocazione attraverso il flusso ascendente della linfa. La distribuzione settoriale dei sintomi da fitoplasmi è più evidente nelle piante perenni ed è un fondamentale elemento distintivo di tali malattie rispetto alle altre nella diagnosi differenziale.

La moltiplicazione avviene di norma negli organi in cui è più elevato il metabolismo, in particolare l'apparato radicale e gli apici vegetativi; avviene secondo diverse modalità: per scissione binaria, per gemmazione, per formazione di corpi elementari all'interno di una cellula madre e loro fuoriuscita per rottura della membrana di quest'ultima, per suddivisione delle cellule filamentose in cellule più piccole. Anche questi processi avverrebbero grazie alla utilizzazione di metaboliti ed energia forniti interamente o quasi dalla pianta-ospite (Belli, 2006).

Durante il loro ciclo vitale, i fitoplasmi instaurano il rapporto trofico con la pianta interferendo con diversi processi fisiologici delle piante: consumano saccarosio e acido 3-indolacetico (IAA), provocando squilibri a livello del trasporto ormonale, anomalie della crescita e nello sviluppo, virescenza, sterilità fiorale, fillomania, proliferazione di gemme ascellari, scopazzi, malformazioni e aborti di fiori e frutti. Il loro accumulo nel floema può causare ostruzioni con conseguenti ingiallimenti ed arrossamenti fogliari, ispessimenti, accartocciamenti, necrosi di nervature e radici. A livello istologico vi sono ipertrofie ed iperplasie del tessuto floematico e collasso dei tubi cribrosi. A livello cellulare, si può notare degenerazione di cloroplasti e mitocondri, degradazione del plasmalemma, diminuzione nel contenuto in clorofilla (Marzachi *et al.*, 2004). Il risultato macroscopico della interazione tra fitoplasmi e piante ospiti è simile a quello causato da somministrazione in dosi eccessive di ormoni sintetici o di erbicidi ormonici, da cui sono distinguibili proprio per la distribuzione settoriale sulla pianta che diventa diffusa in caso di erbicidi.

Proprio per la peculiarità dei sintomi, i nomi dati alle malattie provocate dai fitoplasmi, sono riferiti per lo più alla pianta ospite ed al tipo di sintomo.

La temperatura gioca un ruolo molto importante nella manifestazione dei sintomi delle malattie da fitoplasmi; si nota infatti una maggiore frequenza nelle regioni temperate più che in quelle tropicali.

## 8.4 Epidemiologia

La trasmissione può avvenire per propagazione vegetativa di piante infette (innesto, talea etc.), anastomosi radicale (Vindimian *et al.*, 2002), ponti di *Cuscuta* (Ploaie, 1981), e più raramente per seme (Cordova *et al.*, 2002; Marzachi *et al.*, 2004). Tuttavia, il più efficace veicolo di diffusione di questi patogeni sono gli insetti vettori (Marzachi *et al.*, 2004).

La trasmissione per propagazione vegetativa avviene in percentuali alquanto variabili a seconda del binomio patogeno-pianta; in genere, soprattutto nelle specie legnose dove viene praticato l'innesto, si verificano percentuali di trasmissione non elevate, probabilmente a causa dell'irregolare distribuzione dei fitoplasmi nelle diverse parti della pianta infetta.

La trasmissione tramite insetti vettori è certamente molto più efficace ed avviene ad opera di insetti appartenenti all'ordine Rhynchota (= Hemiptera) e, per la maggior parte, alle famiglie Cixiidae e Cicadellidae del sottordine Auchenorrhyncha (=Cicadina) ed anche dalla superfamiglia Psylloidea del sottordine Sternorrhyncha. Questi insetti hanno la capacità di trasmettere efficacemente i fitoplasmi per le seguenti caratteristiche: sono dotati di apparato boccale pungente succhiante; svolgono attività trofica floemomiza e non distruttiva evitando di determinare risposte di difesa alla puntura nei tessuti della pianta; sono emimetaboli con ninfe ed adulti che si nutrono allo stesso modo ed hanno la stessa localizzazione sulla pianta; hanno rapporti propagativi e relazioni persistenti con i fitoplasmi; possono avere trasmissione trans ovarica dei fitoplasmi così come avviene per i procarioti simbiotici normalmente presenti in queste specie di insetti.

La trasmissione ed il rapporto tra l'insetto vettore ed il fitoplasma è solitamente di tipo persistente-circolativo-propagativo e consta di tre fasi distinte ma interconnesse: acquisizione, latenza, inoculazione (Alma e Conti, 2002; Conti e Vidano, 1988). L' *acquisizione* è la fase in cui il vettore, nutrendosi a spese del tessuto floematico di piante infette, assume il fitoplasma; la durata di questa fase può variare da ore a giorni (indicativamente 2-3 giorni). La *latenza* corrisponde all'intervallo di tempo necessario affinché il vettore che ha acquisito i fitoplasmi durante l'alimentazione passi da infetto ad infettivo. Durante questa fase i microrganismi patogeni passano dall'intestino medio, per via emolinfatica, alle cellule di vari organi del vettore, comprese le ghiandole salivari dove si moltiplicano; il periodo di tempo di questa fase può variare da 14 a 28 giorni.

L'*inoculazione* è la fase della trasmissione in cui, attraverso l'immissione della saliva durante l'attività trofica, il vettore è in grado di iniettare i fitoplasmi nella pianta sana; i tempi sono di alcune ore e la probabilità di trasmissione si accresce notevolmente prolungandoli.

Le forme giovanili dell'insetto (neanidi e ninfe) hanno maggiore capacità degli adulti di acquisire fitoplasmi. Importante è anche la fase di *ritenzione* del fitoplasma nel vettore, che può coincidere con la durata della vita del vettore e non risente di eventuali processi di muta. Il periodo di ritenzione o di infettività è rappresentato dal tempo durante il quale il vettore permane infettivo dopo l'acquisizione.

Secondo recenti conoscenze, nel caso delle psille, l'infettività può essere mantenuta dagli adulti durante il periodo di svernamento. Essi possono, infatti, trasmettere il patogeno agli ospiti principali nella successiva primavera anche senza dover compiere ulteriori acquisizioni (Carraro *et al.*, 2001).

Come menzionato, i fitoplasmi possono moltiplicarsi anche nelle cellule di organi di vettori animali e pertanto vengono considerati agenti patogeni sia di piante che di insetti. Non si conoscono però fitoplasmi in grado di infettare animali vertebrati, uomo incluso.

Taluni insetti sono solo in grado di acquisire gli agenti fitopatogeni dalle piante infette ma non di trasmetterli; probabilmente questa incapacità deriva dal fatto che i fitoplasmi ingeriti attraverso l'attività trofica non sono in grado di moltiplicarsi nel corpo dell'insetto; ne è un esempio la *Metcalfa pruinosa* Say, specie polifaga più volte sospettata di trasmettere fitoplasmi alla vite e ad altre piante di interesse agrario (Clair *et al.*, 2001).

Un esempio tipico di trasmissione naturale di fitoplasmi mediante insetti è quello dell'agente della moria del pero (pear decline, PD). Vettori specifici di PD sono le psille del pero (*Cacopsylla pyricola* Först e *C.pyri* L.), che compiono l'intero ciclo (3-5 generazioni/anno) su tale pianta ospite (Blomquist e Kirkpatrick, 2001). È stato dimostrato che una parte degli adulti svernanti continua ad essere infetto ed infettivo fino alla ripresa vegetativa delle piante ospiti, alle quali possono trasmettere il fitoplasma. La trasmissione non sempre avviene su piante in fase di dormienza invernale (Carraro *et al.*, 1998). Gli adulti svernanti depongono le uova sul pero ed i giovani che nascono, alimentandosi, possono infettarsi direttamente se la pianta è ammalata o volare su altre piante infette ed acquisire il fitoplasma. Lo stesso può avvenire per le generazioni successive. Il periodo di acquisizione è di alcuni giorni e quello di latenza di poche settimane. Il vettore rimane infettivo per lunghi periodi ed anche per tutta la vita. La malattia ha un periodo d'incubazione nella pianta variabile da alcuni mesi a 2-3 anni.

Analogamente a quanto avviene per i virus, i fitoplasmi sono facilmente trasmissibili anche attraverso la moltiplicazione vegetativa delle piante: innesto, talea, pollone radicale, tubero, rizoma, bulbo, ecc. La trasmissione sperimentale dei fitoplasmi da piante ammalate a piante sane, oltre che per mezzo d'insetti vettori, si

può ottenere per innesto o mediante ponte-cuscuta ma non per inoculazione meccanica (per succo).

## 8.5 Patogenesi

Dal momento che i fitoplasmi vivono e si moltiplicano all'interno degli elementi cribrosi del floema, l'effetto principale apparente dovuto alle loro infezioni consiste nell'indebolimento della funzione dei tubi cribrosi. Diversi studi hanno mostrato che in piante infette da fitoplasmi si verifica l'inibizione del trasporto floematico, che, a sua volta, comporta l'accumulo di quantità anormali di carboidrati nelle sorgenti dove sono stati sintetizzati (es. foglie mature), ed, al contrario, una marcata riduzione di questi composti, essenziali come riserva di energia, negli organi di utilizzazione (es. foglie giovani e radici) (Catlin *et al.*, 1975; Braun e Sinclair, 1978; Kartte e Seemüller, 1991a; Lepka *et al.*, 1999; Guthrie *et al.*, 2001; Maust *et al.*, 2003). Le modificazioni nella traslocazione dei prodotti fotosintetizzati insieme all'indebolimento di altre funzioni fisiologiche, incluse riduzione della fotosintesi, conduttanza stomatica e respirazione radicale, nonché l'alterazione del metabolismo secondario e lo squilibrio ormonale, forse dovuti ad una disfunzione floematica, potrebbero giustificare i sintomi mostrati dalle piante infette (McCoy, 1979; León *et al.*, 1996; Lepka *et al.*, 1999; Tan e Whitlow, 2001; Maust *et al.*, 2003; Choi *et al.*, 2004). Tuttavia, i meccanismi coinvolti nello sviluppo dei sintomi o i geni che controllano questi eventi sono ancora poco conosciuti. Studi recenti sugli effetti delle infezioni da fitoplasmi sull'espressione genica della pianta ospite hanno mostrato che sintomi di anomalie fiorali in piante di pomodoro infette dal fitoplasma stolbur (STOL) sono associati ad una regolazione negativa del gene chiave dello sviluppo florale (Pacros *et al.*, 2006), mentre, in piante di poinsettia (*Euphorbia pulcherrima*) affette da proliferazione dei rami, i geni coinvolti nell'attività dei fitormoni, che risultano sovra-espressi in seguito ad infezioni da fitoplasmi, potrebbero avere un ruolo maggiore nell'espressione dei sintomi (Nicolaisen e Horvath, 2008).

Le piante infette da fitoplasmi mostrano un ampio spettro di sintomi specifici e non-specifici. In ogni caso, i sintomi mostrati dalle piante malate variano a seconda del fitoplasma, della pianta ospite, dello stadio della malattia, dell'età della pianta al momento dell'infezione e delle condizioni ambientali (McCoy, 1979; McCoy *et al.*, 1989; Lee *et al.*, 2000; Seemüller *et al.*, 2002). In rari casi le piante infette da fitoplasmi risultano completamente asintomatiche nel corso della loro vita; potrebbe anche verificarsi una remissione temporanea o permanente dei sintomi.

### 8.5.1 Possibili fattori coinvolti nello sviluppo della malattia

Nonostante siano ancora poco chiari i meccanismi patogenetici coinvolti nelle malattie da fitoplasmi, sono qui di seguito citati gli studi e le acquisizioni più recenti.

**Virulenza del ceppo** - Lo sviluppo e intensità dei sintomi di una malattia dipende dalla virulenza del ceppo del fitoplasma all'interno di un dato gruppo. Sono state osservate grandi differenze nella virulenza fra ceppi di diversi fitoplasmi, inclusi scopazzi del melo (AP), giallume europeo delle drupacee (ESFY), giallumi del frassino (AshY) (*'Ca. Phytoplasma fraxini'*) e giallumi dell'ontano (ALY). In uno studio recente, condotto da Seemüller e Schneider (2007), è stata studiata la virulenza di 24 ceppi del fitoplasma AP inoculando alberi di mele "Golden Delicious" e monitorando lo sviluppo dei sintomi durante un periodo di 12 anni. In base alla sintomatologia, i ceppi sono stati classificati in tre gruppi di virulenza definiti come: (i) non/poco virulento; (ii) moderatamente virulento; (iii) severamente virulento. I ceppi del primo gruppo non inducevano sintomi o inducevano sintomi molto blandi e mai specifici di AP. I ceppi degli altri gruppi inducevano sintomi da moderati a severi, inclusi sintomi tipici di AP. Un simile ed ampio range di virulenza è stato osservato in un precedente lavoro, in cui alberi di differenti genotipi di *Prunus* sono stati inoculati con 20 ceppi del fitoplasma ESHY (Kison and Seemüller, 2001). Differenze nella virulenza dei ceppi sono note anche per il fitoplasma AshY in piante di frassino e di pervinca (Sinclair e Griffiths, 2000b).

**Interferenza fra ceppi** - In diverse combinazioni fitoplasmi-pianta ospite sono state descritte interferenze fra ceppi dello stesso gruppo. Studi condotti da Sinclair e Griffiths (2000a) mostrano che, in piante di pervinca che erano state co-inoculate con due ceppi del fitoplasma AshY, i quali differivano fortemente per virulenza, il ceppo più aggressivo veniva rilevato molto prima e molto più frequentemente rispetto al ceppo meno aggressivo nelle foglie distanti dal punto di inoculazione. Pertanto, la virulenza è stata associata o ad un maggiore movimento o ad un più elevato grado di moltiplicazione del ceppo virulento rispetto a quello meno aggressivo. Tuttavia, inoculando uno dei due ceppi, 11 settimane prima dell'altro, nella stessa pianta, solo il ceppo iniziale veniva rilevato dopo altre 12 settimane di incubazione. Quindi, il primo ceppo o il suo effetto sull'ospite potrebbe aver interferito con il movimento a lunga distanza o con la moltiplicazione del secondo ceppo. Tali risultati indicano una reazione di protezione incrociata (cross-protection). Il ceppo che viene inoculato prima, quasi sempre predomina, e previene lo sviluppo dei sintomi dovuti al ceppo concorrente. Diverso è il caso di piante di tabacco inoculate con diversi ceppi di *'Ca. Phytoplasma asteris'*, inizialmente con un ceppo di TLAY e, una settimana dopo, con ceppi DAY o SAY che causano rispettivamente nanismo o sintomi gravi. In questi casi, la pianta sviluppava prima i sintomi tipici dell'infezione da TLAY, e in secondo luogo guariva completamente,

indicando, così, un fenomeno di soppressione reciproca che portava alla neutralizzazione dei due ceppi (Berges e Seemüller, 2002).

**Concentrazione dei fitoplasmi** - Le dimostrazioni comprovanti la grande variabilità di concentrazione dei fitoplasmi nelle piante infette sono in continuo aumento. Tra gli ospiti con un elevato titolo di fitoplasmi ritroviamo la pervinca ed altre specie erbacee, incluse lattuga, sedano, tabacco e diverse specie del genere *Brassica*. Al contrario sono pochi gli ospiti conosciuti fra le specie legnose, nelle quali la concentrazione dei fitoplasmi spesso è al di sotto dei livelli di rilevamento tramite metodi microscopici (Bergers *et al.*, 2000). Tuttavia, in alcuni generi di piante legnose si ritrovano ospiti sia con basso che con elevato titolo di fitoplasmi. Generalmente, la concentrazione di fitoplasmi viene riportata come un importante fattore di patogenicità, pertanto è possibile che nei diversi ospiti, con bassa e con alta concentrazione del patogeno, esistano meccanismi di patogenicità differenti. Inoltre, piante che differiscono per suscettibilità e, quindi per concentrazione di fitoplasma legata alle sue capacità di replicazione, possono dare una risposta molto diversa alle infezioni del patogeno. Studi precedenti hanno mostrato che alberi di mele sui portinnesti *M. x domestica*, *M. silvestris* e *M. domestica x baccata* infetti con il fitoplasma AP presentano un elevato titolo del patogeno, un'elevata frequenza di scopazzi come sintomo specifico ed un ridotto grado di mortalità. In queste specie, sia le condizioni del floema che il contenuto di amido nelle radici differiscono solo leggermente da quelle degli alberi sani. Pertanto, i tubi cribrosi risultano piuttosto tolleranti all'infezione e mostrano buone proprietà come ospiti, consentendo la moltiplicazione e la diffusione del patogeno. Al contrario, in genotipi come *M. tschonoskii*, *M. kansuensis* e *M. sargentii*, il titolo di fitoplasma risulta estremamente basso, si sviluppano solo sintomi non specifici di giallumi e si verifica un alto grado di mortalità. A livello radicale queste specie sono caratterizzate da estese necrosi del floema e dalla riduzione dell'amido. I loro tubi cribrosi risultano così sensibili all'infezione del fitoplasma tanto da collassare prima che il patogeno raggiunga un titolo elevato (Kartte e Seemüller, 1991a, b).

D'altro canto, è stato anche riportato che l'attitudine dell'ospite, intesa come concentrazione relativa di fitoplasma nei suoi tessuti, non è, ovviamente, il solo fattore determinante per lo sviluppo della malattia. Infatti, l'effetto patogenetico dell'infezione da fitoplasmi potrebbe essere di natura qualitativa piuttosto che quantitativa (Seemüller *et al.*, 2007).

**Tossine** - A causa della scarsa correlazione esistente tra la presenza del fitoplasma e le aberrazioni del floema o i sintomi esterni manifestati dalla pianta infetta, diversi autori hanno ipotizzato un effetto a lunga distanza tramite metaboliti tossici derivati o indotti dal patogeno e coinvolti nell'azione patogenetica (Schneider, 1977b; Douglas, 1986; León *et al.*, 1996; Siddique *et al.*, 1998; Guthrie *et al.*, 2001; Tan e Whitlow, 2001). Ancora non sono stati riportati studi sull'identificazione e la caratterizzazione di sostanze tossiche in piante infette da

fitoplasmi, né sono stati identificati geni che mostrano una significativa similarità di sequenza con geni tipici della patogenicità.

**Squilibri ormonali** - Le considerevoli anomalie riscontrate nella crescita e nello sviluppo delle piante a causa di fitoplasmi suggerisce un profondo disordine nell'equilibrio ormonale della pianta. Ad esempio, in piante di pervinca malate è stata osservata una riduzione dei livelli di citochinina nelle foglie mature e nelle radici ed un aumento della stessa nei fiori, mentre in palme da cocco affette da LY (Lethal Yellowing) è stato osservato un aumento della concentrazione dell'acido abscissico e dell'etilene nelle foglie. Inoltre, è stata provata l'associazione tra l'infezione di piante di pervinca micropropagate con il fitoplasma AY e la marcata riduzione dei livelli endogeni di auxina (Kirkpatrick, 1991; León *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 2000; Tan e Withlow, 2001). Tuttavia, non è noto se i fitoplasmi sono in grado di sintetizzare regolatori della crescita delle piante, come alcuni batteri patogeni, o se modificano i livelli naturali di uno o più ormoni endogeni della pianta. Al contrario, Smart e Kirkpatrick (Lee *et al.*, 2000) hanno riportato che mutanti di *Arabidopsis thaliana*, insensibili a variazioni di concentrazione di acido abscissico, auxina, etilene o gibberellina, mostravano tipici sintomi di virescenza e fillodia a seguito di infezioni con il fitoplasma AY. Pertanto, gli autori hanno concluso che cambiamenti nei livelli di questi fitormoni non possono essere ritenuti responsabili dell'espressione dei sintomi. Al fine di ottenere dati attendibili sul ruolo delle infezioni da fitoplasmi nello squilibrio ormonale della pianta, nonché la relazione esistente tra l'infezione e l'espressione dei sintomi, sono necessari ulteriori studi, soprattutto a livello molecolare.

**Adesione alla membrana cellulare dell'ospite** - L'adesione alla membrana cellulare dell'ospite è un aspetto caratteristico di molti mollicuti patogeni dell'uomo e degli animali ed è considerato un importante requisito per la patogenicità. Questa adesione è mediata dalle adesine, proteine di superficie, che in alcune specie sono organizzate in strutture specializzate. Diversi studi hanno mostrato che in molti fitoplasmi esiste un sottogruppo di proteine di membrana, definite proteine di membrana immunodominanti (IDPs), che rappresentano una porzione importante del totale delle proteine cellulari di membrana (Hogenhout *et al.*, 2008). Geni codificanti per le IDPs sono stati isolati da diversi fitoplasmi. Queste proteine sono state classificate in tre differenti gruppi sulla base del loro tipo di interazione con il doppio strato lipidico. Grazie alla loro collocazione e alla relativa abbondanza, le IDPs sono buone candidate per le interazioni ospite-fitoplasma. Apparentemente funzionano come adesine e permettono l'adesione del fitoplasma alla cellula ospite. Infatti, osservazioni condotte al microscopio, a trasmissione e a scansione, hanno messo in evidenza che i fitoplasmi parassiti risultano attaccati alla superficie interna dei tubi cribrosi della membrana plasmatica.

**Altri determinanti di patogenicità** - L'analisi comparativa dei genomi dei pochi fitoplasmi oggi interamente sequenziati, ha messo in evidenza la presenza di diversi potenziali fattori di virulenza (Hogenhout *et al.*, 2008).

Le diverse tecniche molecolari di recente introduzione, come il differential display o la PCR con primer arbitrari, che facilitano il rilevamento dell'espressione differenziale dei geni, sono state applicate al fine di studiare la biologia dei Mollicuti fitopatogeni in diverse condizioni ambientali, nelle piante e negli insetti vettori. Le infezioni da fitoplasmi possono portare alla produzione di proteine di difesa, ad un aumento dei composti fenolici e ad una sovrapproduzione di perossido di idrogeno nelle piante ospiti (Musetti *et al.*, 2000, 2005; Junqueira *et al.*, 2004). Utilizzando il metodo del differential display dell'RNA messaggero, Smart e collaboratori (1996b) hanno ritrovato geni differenzialmente regolati in piante di *Arabidopsis* in seguito ad infezione con il fitoplasma aster yellow. Inoltre, Jagoueix-Eveillard e collaboratori (2001) hanno isolato, da piante di pervinca, diversi geni sovra- e sotto-espressi in seguito all'infezione di *Spiroplasma citri*, di stolbur o 'Ca. P. aurantifolia'. Otto di questi geni avevano omologie con geni codificanti per proteine coinvolte nella fotosintesi, nel trasporto degli zuccheri, nella risposta allo stress, o nella via di sintesi dei fitosteroli. Gli stessi ricercatori hanno, inoltre, mostrato, che il gene codificante per una proteina indotta dal patogeno, una chinasi associata alla parete, viene attivato dall'infezione di *S. citri*. In *Arabidopsis* questo gene viene anche indotto dall'acido salicilico ed è coinvolto nella risposta di difesa della pianta.

Molti batteri patogeni gram-negativi che infettano le piante e gli animali utilizzano un sistema di secrezione tipo-III (TTSS) per rilasciare fattori di virulenza all'interno della cellula ospite. Questi fattori di virulenza procariotici spesso simulano le proteine eucariotiche, permettendo al patogeno di modulare i sistemi biologici dell'ospite, favorendo l'invasione, la moltiplicazione e la diffusione batterica (Stebbins e Galan, 2001). Questi fattori di virulenza sono spesso coinvolti nella soppressione dell'immunità della pianta (Abramovitch *et al.*, 2006). I fitoplasmi sono privi di geni che codificano per TTSS (Oshima *et al.*, 2004). Tuttavia, dal momento che essi risiedono all'interno delle cellule della pianta, possono secernere proteine attraverso il sistema di traslocazione batterico Sec, le quali possono funzionare, nel citoplasma dell'ospite, come fattori di virulenza TTSS (Hogenhout *et al.*, 2008). Infatti, di recente è stato riportato che i fitoplasmi producono una proteina che ha come target il nucleo delle cellule dell'ospite (Bai *et al.*, 2009).

### 8.5.2 Il gene *TENGU*

Recentemente è stata identificata una proteina, l'induttore "tengu-su" (TENGU), ipotizzata quale fattore di virulenza responsabile dei sintomi di scopazzi e nanismo. Il nome tengu-su deriva dal giapponese dato che per i ricercatori i sintomi di scopazzi assomigliano al nido del Tengu, un mitico goblin giapponese. La malattia fu, quindi, definita Tengu-su (nido di Tengu) a causa di questi caratteristici sintomi che per diverso tempo hanno affascinato gli agricoltori giapponesi. Hoshi e collaboratori (2009) hanno dimostrato che il gene codificante la proteina TENGU,

del peso di circa 4,5 kDa ed esclusiva dei fitoplasmi, induce scopazzi e nanismo quando espresso in piante di *Nicotiana benthamiana* e *Arabidopsis thaliana*. Nonostante la localizzazione dei fitoplasmi sia ristretta al floema, la proteina TENGU è stata rilevata nei germogli apicali tramite analisi immuno-istochimiche a dimostrazione del fatto che essa era trasportata dal floema verso altre cellule. Inoltre, l'analisi microarray ha rivelato che i geni di risposta dell'auxina risultano sottoespressi in piante "tengu"-transgeniche a confronto con piante controllo GUS-transgeniche. Questi risultati indicano che TENGU inibisce le vie metaboliche relative all'auxina, influenzando, pertanto, sullo sviluppo della pianta (Hoshi et al., 2009).

## **SCOPO DEL LAVORO**

La teratologia studia, sia in zoologia che in botanica, le mostruosità o anomalie morfologiche degli esseri viventi. Con riferimento alla branca botanica, essa ha affascinato diversi studiosi nei secoli passati ma ha, apparentemente, destato meno interesse nell'ultimo secolo tanto da essere relegata a "curiosità" per amatori o collezionisti, più che a branca scientifica.

Tale regressione può essere giustificata dalle nuove acquisizioni scientifiche e da recenti approcci di ricerca applicati in botanica, per lo più motivati da problematiche quali la preservazione della biodiversità o la salvaguardia ambientale; ma appare priva di criterio scientifico la perdita o la scarsa valorizzazione di informazioni scientifiche tanto vaste ed, anticamente, utilizzate ai fini di concezioni filosofiche deterministe e di interpretazioni mistico-religiose. Nondimeno, alla luce delle importanti spinte alla ricerca biologica data dagli studi genomici alla determinazione del fenotipo degli esseri viventi, appare interessante una rivisitazione e una modernizzazione di tale scienza. Del resto, raramente un settore della biologia applicata, sia vegetale che umana, è riuscito ad interessare campi filosofici così vasti, collegati alla stigmatizzazione e rappresentazione di quesiti dell'uomo, esistenziali e religiosi insieme.

La cospicua produzione scientifica del periodo compreso tra il 1800 e 1900 rappresenta un patrimonio fondamentale delle scienze della vita e della biologia vegetale in particolare, e risulta assai degna di valorizzazione alla luce delle nuove scoperte biologiche e molecolari.

Proprio le scoperte sulla composizione e modalità di azione degli acidi nucleici hanno dato un forte impulso a settori scientifici differenti tra cui la patologia vegetale. L'applicazione delle tecniche di biologia molecolare hanno ampliato esponenzialmente le acquisizioni di questo settore fino alla scoperta di microrganismi ed entità patogene "non visibili" quali virus, viroidi e fitoplasmi. A queste indagini si aggiungono gli studi di interazione tra patogeni e piante ospiti e dei meccanismi di determinazione degli squilibri fisiologici che portano alla manifestazione della malattia, intesa come insieme di sintomi o malformazioni detrimentalmente per la pianta.

L'idea base di questa tesi di dottorato, e cioè quella di rivalutare gli studi teratologici del passato utilizzando le nuove tecniche molecolari e fornendo un approccio di "risoluzione del problema" differente da quello tradizionalmente utilizzato dai botanici nel trattamento delle malformazioni, è apparsa immediatamente affascinante e d'impatto nella rivalutazione ed utilizzo di questo patrimonio della botanica.

Lo scopo generale di queste ricerche è stato, pertanto, quello di rivisitare il concetto di teratologia tramite l'interazione di studi di botanica tradizionale, di patologia vegetale e di biologia molecolare. Il parallelismo tra una delle branche della Patologia vegetale, la semeiotica o studio dei sintomi, vuole qui essere preliminarmente superata attraverso l'utilizzo di altre branche di studio tra cui la diagnostica, quale rilevamento ed identificazione di entità patogene responsabili di quadri sintomatologici, e la patogenetica, lo studio dei meccanismi di interazione tra pianta e patogeno nella determinazione delle malattie delle piante. Tale parallelismo viene definito apparente in considerazione dello scopo principale delle due scienze: la patologia vegetale studia i sintomi o malformazioni o deviazioni dallo stato normale di una specie vegetale quali segni di una malattia, allo scopo di definirne la causa (agente causale o patogeno) e la cura, mentre l'accezione tradizionale della teratologia la rende legata solo ad un interesse "collezionistico". Una visione integrata delle due scienze potrebbe proporre una visione più moderna ed applicativa di tale branca della botanica senza però trascurare o negare alcuni degli aspetti filosofici in cui è stata coinvolta.

Gli scopi specifici dell'attività di ricerca sono la raccolta di casi teratologici in piante, la definizione di eventuali entità patogene coinvolte nella loro determinazione e lo studio di alcuni possibili processi patogenetici responsabili della manifestazione teratologica visibile.

Al fine di perseguire tali obiettivi è apparso pertanto necessario, oltre alla raccolta e catalogazione di casi teratologici secondo criteri classici di documentazione, implementare i dati sui casi riscontrati tramite l'identificazione e la caratterizzazione delle entità patogene possibilmente coinvolte nella determinazione del quadro teratologico/sintomatologico.

Le malformazioni, o deviazioni dalla norma, di maggiore interesse della teratologia sono quelle definite in patologia vegetale quali sintomi rientranti nel gruppo delle "modificazioni di forma". I gruppi di patogeni coinvolti in questo tipo di malformazione sono, principalmente, i fitoplasmi, sparse specie di batteri e, marginalmente, i virus ed i viroidi. L'importanza relativa di quest'ultimo gruppo di patogeni risiede nella maggiore complessità e molteplicità dei sintomi da essi indotti nei quadri di malattia e che raramente corrispondono a semplici sintomi di modificazioni di forma.

La ricerca di casi teratologici è stata, quindi, implementata dalla definizione e caratterizzazione di fitoplasmi e batteri potenzialmente coinvolti. La diagnosi e caratterizzazione di tali patogeni comporta l'applicazione di tecniche di biologia molecolare dato che tali gruppi di patogeni, non coltivabili *in vitro*, possono essere identificati solo tramite tali tecniche.

Specificatamente lo scopo generale è stato perseguito tramite i seguenti obiettivi parziali:

- individuazione, catalogazione e documentazione di casi teratologici in piante spontanee e non, in ambienti coltivati e non sul territorio regionale tramite

escursioni mirate in aree protette o in seguito a segnalazioni di botanici o fitopatologi; tra le modificazioni di forma di maggiore interesse sono stati considerati gli scopazzi e le fasciazioni, da soli o in combinazione o in associazione con altri sintomi semplici;

- rilevamento e caratterizzazione di eventuali agenti patogeni batterici responsabili di modificazioni di forma (*Rhodococcus fascians*) nei casi teratologici riscontrati;

- rilevamento, caratterizzazione e classificazione di fitoplasmi associati ai quadri sintomatologici/casi teratologici ritrovati;

- rilevamento di eventuali geni di patogenicità considerati responsabili dell'induzione dei sintomi di interesse nelle piante malformate.

L'approccio integrato degli scopi specifici dell'attività di ricerca e l'utilizzo di tecniche tradizionali e molecolari consente di raccogliere dati la cui integrazione su basi speculative e scientifiche può consentire una interpretazione più "moderna" del concetto di teratologia in cui siano contemplati non solo i fenomeni ma anche le cause determinanti, la loro stabilità e la possibilità di "remissione" delle cosiddette forme botaniche mostruose a forme/fenotipi "normali".

## MATERIALI E METODI

### 1. MATERIALE VEGETALE

Il materiale vegetale, oggetto di studio del presente lavoro, è costituito da diverse specie vegetali erbacee o arbustive, annuali o perenni, spontanee o coltivate, e tutte mostranti delle evidenti teratologie/sintomatologie, ascrivibili ad infezioni da patogeni determinanti squilibri ormonali e risultanti in modificazioni di forma quali: proliferazioni di gemme e contemporanea attivazione di gemme dormienti o blastomania con produzione di scopazzi (affastellamento di rami) e fasciazioni (rami saldati in strutture nastriformi); proliferazione di foglie e di fiori; accorciamento degli internodi e nanismo; virescenza (trasformazione di organi fiorali in strutture di tipo fogliare).

Oltre alle suddette specie sono state studiate alcune succulente, appartenenti alla famiglia delle Cactaceae, descritte come varietà/forme mostruose, allo scopo di individuare eventuali agenti patogeni potenzialmente responsabili della determinazione di tali forme. Precedenti studi su cladodi modificati di *Opuntia ficus-indica* L. (Cai *et al.*, 2002; Granata *et al.*, 2006; Tessitori *et al.*, 2006; Hernández-Pérez R. *et al.*, 2009; Fucikovský Zak L. *et al.*, 2011) avevano, infatti, messo in luce la presenza di fitoplasmi, quali agenti patogeni associati a tali modificazioni di forma. Le succulente appartenenti alla famiglia delle Cactaceae prescelte sono state: *Austrocyllindropuntia exaltata* (A. Berger) “monstruosa”, *Opuntia subulata* Engelm. “monstruosa”, *Opuntia cylindrica* (Lam.) DC. “monstruosa” ed *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. Le piante sono state acquistate presso vivai, ad eccezione di campioni di *Opuntia ficus-indica* in collezione presso il Dipartimento di Scienze delle Produzioni Agrarie e Alimentari, sezione Fitopatologia e Genetica vegetale dell’Università di Catania.

Si è voluto, inoltre, investigare sull’azione di patogeni anche sulla specie commerciale *Celosia plumosa* Hort. ex Burvenich, acquistate presso un vivaio, mostranti fasciazioni sulle spighe fiorali, e piante di *Celosia crestata* L., prodotte da seme presso il nostro laboratorio, le cui spighe fiorali presentano evidenti fasciazioni che si evolvono in crestature.

Il campionamento o registrazione delle specie spontanee e coltivate, rinvenute con i suddetti sintomi, è stato effettuato durante escursioni in campo, sia all’interno che all’esterno di aree protette del territorio siciliano, e attraverso segnalazioni da parte di docenti e colleghi.

Nel caso in cui nei siti di rilevamento fosse registrata un'elevata frequenza di piante sintomatiche, si è reso necessario monitorare costantemente i siti, allo scopo di studiare l'evoluzione sintomatologica sulle specie durante le stagioni, analizzando parti di pianta in diverse fasi fenologiche, per l'individuazione e correlazione con gli eventuali patogeni.

Ogni campione individuato o conferito presso il nostro laboratorio, identificato in alcuni casi attraverso l'uso di chiavi analitiche, dopo un'attenta documentazione fotografica, sia in campo che in laboratorio, è stato catalogato progressivamente attraverso l'uso di schede teratologiche implementate, allo scopo di registrare tutti i dati e i risultati ottenuti (osservazioni di campo ed analisi di laboratorio) per ogni caso. I principali dati inclusi nelle schede (Fig. 17) sono stati:

- *numero progressivo* per ciascuna scheda, con lo scopo di ordinare i casi repertati, secondo il periodo di ritrovamento;
- *teratologia/sindrome*, con descrizione del tipo e intensità dei sintomi nonché la distribuzione del sintomo sulla pianta (sindrome settoriale o riguardante intera pianta);
- binomio latino della *specie* studiata, in base alle regole del Codice Internazionale di Nomenclatura, e *famiglia* di appartenenza;
- *note corologiche* definite dalla distribuzione geografica della specie (Pignatti, 1982);
- *forma biologica* secondo il sistema di Raunkiaer, in modo da sintetizzare l'informazione relativa al portamento della pianta (Raunkiaer, 1934);
- *fase fenologica*, ovvero la fase di sviluppo al momento del ritrovamento;
- dati sulla *frequenza del caso repertato* intesa come diffusione di piante sintomatiche rispetto a quelle sane nel sito di ritrovamento; è stata utilizzata una scala empirica, con valori da 0 a 3, in base ai seguenti criteri:
  - 0 = sindrome osservata su pianta singola, piante in collezione e commerciali
  - 1 = sindrome poco diffusa ( $\sim \leq 20\%$ )
  - 2 = sindrome diffusa ( $\sim 20-50\%$ )
  - 3 = sindrome molto diffusa ( $\sim \geq 50\%$ );
- *dati stazionali*, luogo di prelievo del campione;
- *periodo di rinvenimento*, mese ed anno di prelievo;
- *protocollo di estrazione di acidi nucleici totali*, con indicazione del protocollo di estrazione scelto (autore ed anno);
- risultati delle reazioni di *PCR + nested-PCR*, con primer utilizzati nella reazione di amplificazione ed il risultato, indicato con il segno (+) o (-) in base alla positività o meno a fitoplasmi;
- *clonaggio in Escherichia coli*, nel caso in cui fosse stato necessario effettuare tale passaggio ai fini del sequenziamento del DNA fitoplasmale o batterico rilevato (indicato con si) e per la conservazione e catalogazione dei cloni ottenuti. Se non effettuato si registrava con n. e . (non effettuato);

- sequenziamento del DNA fitoplasmale, necessario ai fini della classificazione ed identificazione della specie (DNA ottenuto tramite clonaggio o per sequenziamento diretto dei prodotti PCR);
  - *RFLP virtuali*, per l'assegnazione del gruppo/sottogruppo di classificazione dei fitoplasmi;
  - Gene TENGU, PCR con primer specifici per l'identificazione del gene di patogenicità TENGU in fitoplasmi gel gruppo I;
    - *isolamento batterico*, con particolare riferimento all'isolamento per il rilevamento di eventuali infezioni da *Rhodococcus fascians*;
    - *PCR DNA batterico*, nel caso in cui venivano isolate colonie sospette di *R. fascians*, in base alle caratteristiche morfologiche e reazione Gram (saggiati solo Gram positivi con colore e forma riferibili a *R. fascians*), era necessario procedere ad analisi PCR (primer generici o specifici);
      - *sequenziamento del DNA batterico*, è stato effettuato solo nel caso di prodotti PCR con primer generici allo scopo di identificare il batterio; veniva indicato solo se effettuato (si) altrimenti indicato con n.e (non effettuato);
    - *note bibliografiche*, in questa sezione della scheda sono state incluse precedenti informazioni bibliografiche riguardanti la stessa teratologia sulla stessa specie e l'eventuale individuazione di patogeni ad essa associate (schede teratologiche, segnalazione di patogeni, etc.).
  - al termine di ciascuna scheda è stata riportata la *documentazione fotografica* della teratologia.

SCHEDA NUMERO:	
TERATOLOGIA/SINDROME	
SPECIE	
FAMIGLIA	
NOTE COROLOGICHE	
FORMA BIOLOGICA	
FASE FENOLOGICA	
DATI SULLA FREQUENZA DEL CASO REPERTATO	
DATI STAZIONALI	
PERIODO DI RINVENIMENTO	
PROTOCOLLO DI ESTRAZIONE DI ACIDI NUCLEICI TOTALI	
PCR + NESTED PCR	
CLONAGGIO IN <i>ESCHERICHIA COLI</i>	
SEQUENZIAMENTO DNA FITOPLASMALE	
RFLP VIRTUALI	
GENE TENGU	
ISOLAMENTO BATTERICO	
PCR DNA BATTERICO	
SEQUENZIAMENTO DNA BATTERICO	
NOTE BIBLIOGRAFICHE	

## DOCUMENTAZIONE FOTOGRAFICA

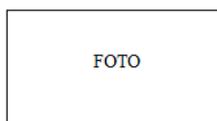


Fig. 17. Modello di scheda su cui sono stati trasferiti i dati relativi ai campioni analizzati

Durante le ispezioni in campo sono stati raccolti campioni vegetali, da sottoporre ad analisi di laboratorio, derivanti sia da piante sintomatiche sia da piante della stessa specie non mostranti sintomi, da usare quali “controlli negativi” (piante non infette da patogeni) nelle analisi molecolari di diagnosi. I campioni vegetali raccolti, denominati e registrati per data, sono stati trasportati e mantenuti a 4°C fino alla effettuazione delle analisi di laboratorio. Aliquote di materiale vegetale raccolto è stato, inoltre, conservato a -20°C in modo da poterne disporre nel caso fosse necessario ripetere le analisi.

La scheda teratologica, dapprima compilata in campo o in base alle informazioni date da chi segnalava i casi, veniva successivamente implementata in laboratorio, in base alle analisi prescelte per singolo campione ed in base ai risultati ottenuti.

## **2. IDENTIFICAZIONE DI ISOLATI BATTERICI**

### **2.1 Isolamento e morfologia delle colonie**

Gli isolamenti per la ricerca di batteri agenti di fasciazioni sono stati effettuati su erbacee ed arbustive, spontanee o coltivate specie vegetali caratterizzati da tessuto vegetali a composizione differente.

Piccole porzioni di pianta sono state lavate in acqua sterile e successivamente col supporto di un bisturi sono state asportate piccole porzioni di pianta con sintomi di fasciazioni (circa 2-3 mm). I tasselli sono stati immersi in una soluzione fisiologica contenente lo 0,02% (vol/vol) di fungicida Sandofan CL (Novartis) e sottoposti a incubazione per un intervallo di tempo compreso tra i 30 e i 120 minuti a temperatura ambiente. Venti microlitri di sospensione sono stati insemiati sia su substrato generico di crescita Agar Nutritivo (Oxoid S.p.A., Milano) addizionato dell'1% di D-Glucosio (AND) sia su substrato selettivo D2 medium (10 g D (+) Glucose, 4 g Casein hydrolysate, 2 g Yeast extract, 1 g NH<sub>4</sub>Cl, 0,3 g MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 5 g LiCl, 1,2 g Tris (hydroxymethyl) aminomethane, 15 g Agar, 1000 ml ddH<sub>2</sub>O, pH 7.8, 1 ml/L di Sodium azide, 1,6 ml/L di Polymyxin B surfate) (Kado *et al.*, 1970) per facilitare l'isolamento del batterio *Rhodococcus fascians*. Le capsule Petri sono state poste in termostato a 27°C.

Poiché *R. fascians* cresce più lentamente di altri batteri che contaminano la superficie delle piante e potrebbe non essere isolato se presente in bassa concentrazione, anche in seguito alla presenza di batteri più vigorosi che crescono molto velocemente, le piastre sono state controllate dopo i primi 5 giorni e monitorate giornalmente fino ad un massimo di 15 giorni.

Inizialmente le colonie ottenute nelle piastre di isolamento e con morfologia assimilabile a quella di *R. fascians* sono state sottoposte al test del KOH (Suslow *et al.* 1982). Questo metodo sostituisce la tecnica di colorazione Gram, è altrettanto attendibile, consentendo una più rapida distinzione dei batteri gram-positivi dai gram-negativi. La colorazione Gram è uno dei metodi colorimetrici più importanti nella diagnostica molecolare ma questa tecnica rispetto al test del KOH è più elaborata.

Con il test del KOH, tramite un'ansa sterile è stata prelevata un'aliquota della colonia batterica; è stata stemperata, con movimento rapido e circolare, in una goccia di KOH concentrato al 3%, posta su un vetrino, preventivamente sgrassato. Se sollevando l'ansa non si formava un sottile filamento mucoso, il batterio è considerato Gram<sup>+</sup>; nel caso di presenza di filamento, il test indica che il batterio è Gram<sup>-</sup>. La soluzione di KOH 3% rompe le pareti cellulari dei batteri Gram<sup>-</sup> e i lipidi presenti nella parete vengono disciolti dando così luogo ad una sostanza mucosa; i gram-positivi, invece, dopo trattamento con KOH non mostrano alcun cambiamento chimico-fisico.

Le colonie sono state portate in purezza mediante due passaggi successivi su AND e sono stati analizzate per i caratteri morfologici: forma, consistenza, colore e margine. Per verificare la presenza di colonie assimilabili a quelle di *R. fascians* è stata confrontata la morfologia delle colonie ottenute dall'isolamento con quelle del ceppo tipo (CFBP2401) in eguali condizioni di crescita (substrato, età, etc).

## 2.1. Diagnosi dei batteri tramite PCR con primer universali

L'analisi delle sequenze del 16S rRNA, è un metodo molto utilizzato per studiare le posizioni tassonomiche dei microrganismi, ed in questo studio è stato impiegato per uno screening iniziale dei batteri. La sequenza di questa regione è altamente conservata, si tratta di una molecola di DNA ubiquitaria, presente in tutti i procarioti, una molecola complessa che evolve molto lentamente, ma che contiene regioni variabili che permettono di distinguere tra loro i batteri che appartengono a specie diverse.

Le colonie risultate morfologicamente assimilabili al ceppo di riferimento di *R. fascians* (CFBP 2401), e risultate gram-positivo, sono state sottoposte a PCR con la coppia di primer universali 530F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGG-3') e 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACT-3') (Lane, 1991), sintetizzati sulle regioni conservate che amplificano la porzione di DNA comunemente usata per scopi tassonomici (Bottger, 1989; Garrity & Holt, 2001; Harmsen & Karch, 2004).

L'amplificazione di ciascun campione, è stata effettuata utilizzando una piccola porzione di colonia batterica diluita in una miscela di reazione di 50 µl contenente: 25 µl di PCR Master Mix 2X [50 units/ml *Taq* DNA polymerase (pH 8.5), MgCl<sub>2</sub> 3

mM, dNTP 400  $\mu$ M], 2  $\mu$ l di ciascun primer 10  $\mu$ M, 21  $\mu$ l di acqua sterile. La reazione di PCR è stata realizzata in un Gene Amp PCR system 9700 (PE Applied Biosystem), secondo le seguenti condizioni: un ciclo di 5 minuti a 95°C; seguito da 35 cicli ciascuno di un minuto a 94°C, un minuto a 50°C e due minuti a 72°C; per ultimo un ciclo a 72°C per 10 minuti.

I prodotti di PCR sono stati separati mediante elettroforesi in gel di agarosio 1% in tampone TBE 1X. Gli ampliconi sono stati visualizzati mediante colorazione con SYBR<sup>®</sup> Safe<sup>™</sup> DNA Gel Stain (Invitrogen) ed illuminazione con radiazione trasmessa UV (360 nm). La dimensione molecolare della banda di amplificazione è stata stimata confrontando la mobilità elettroforetica relativa rispetto a quella di bande a dimensione nota del marker 1kb DNA Ladder GeneRuler<sup>™</sup> (Fermentas).

L'amplicone è stato esciso dal gel e purificato da primer e nucleotidi con il kit GE Healthcare (GFX<sup>™</sup> PCR and Gel Band Purification Kit), secondo quanto descritto secessivamente nel paragrafo 3.4 (Purificazione del DNA dopo reazioni di PCR). La banda purificata è stata in seguito quantificata tramite corsa elettroforetica su gel d'agarosio all'1% in tampone TBE 1X utilizzando il marker Precision Molecular Mass Ruler (Bio–Rad). Un'aliquota del prodotto PCR è stata inviata al servizio di sequenziamento MWG Genomics e l'analisi della sequenza nucleotidica del gene 16S rRNA ottenuta, confrontata con quelle depositate nella banche dati, utilizzando il software disponibile in rete, NCBI nucleotide-nucleotide BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), ha permesso di procedere all'identificazione.

## 2.2. Sequenziamento del 16S rRNA batterico

Allo scopo di confermare l'identità di *R. fascians* o di discriminare specie differenti, si è proceduto al sequenziamento del gene 16S rRNA. Gli ampliconi ottenuti con i primer universali 530F/1492R (1000 bp), sono stati sequenziati tramite metodo enzimatico (Sanger *et al.*, 1977), presso i laboratori BMR Genomics s.r.l. (Padova) che utilizzano ABI 3730XL e ABI 3100. Si è proceduto al sequenziamento diretto del prodotto PCR, utilizzando come primer di sequenziamento gli stessi utilizzati per la reazione di amplificazione.

## 2.3. Primer specie-specifici per l'identificazione di *Rhodococcus fascians*

Al fine di identificare solo la specie *R. fascians* è stata utilizzata la coppia di primer specie-specifici, JRERIGHT: 5'-CGGGATCCATATCGAACCGCCCTC-3'

e JRELEFT: 5'-GGGAATTCCGACCGTATCCAGTGT-3', progettati dal Centro di Ricerca Genetica dell'Università di Otago, in Nuova Zelanda (Stange *et al.*, 1996).

La coppia di primer, amplifica un frammento di 225 bp che corrisponde al gene monossigenasi P450 e alla regione plasmidica *fas-1* del plasmide lineare (Crespi *et al.*, 1992), responsabili per la virulenza.

La reazione è stata eseguita in un volume di 50 µl di miscela di reazione contenente: 25 µl di PCR Master Mix 2X, 2 µl dei primer sovradescritti 10 µM e due microlitri di DNA come bersaglio per la reazione.

Le reazioni di PCR sono state eseguite con il termociclatore GeneAmp<sup>®</sup> PCR system 9700, Applied Biosystem con le seguenti condizioni: un ciclo di denaturazione iniziale a 95° C per 5 minuti, 35 cicli a 94° C per 1 minuto, 50° C per 1 minuto, 72° C per 2 minuti, e un ciclo finale di estensione dei filamenti di DNA a 72° C per 10 minuti.

Aliquote di 20 µl dei prodotti di amplificazione sono stati verificati mediante elettroforesi in gel di agarosio (1%) in tampone TBE 1X, pH 7,8, a 5,6 V cm<sup>-1</sup>. Un marcatore di peso molecolare noto (EZ Load 100 bp PCR Molecular Ruler - Bio-Rad) è stato utilizzato in tutte le corse elettroforetiche. I prodotti di PCR sono stati visualizzati mediante colorazione con SybrSafe (1µg·ml<sup>-1</sup>) e le immagini digitalizzate mediante ChemiDoc<sup>™</sup> EQ (Bio-Rad, Laboratories).

#### 2.4. Profilo metabolico e identificazione automatizzata

Il metodo Biolog permette l'identificazione delle specie microbiche attraverso la definizione di un profilo nutrizionale. Il test consiste nel saggiare contemporaneamente per ogni isolato batterico la capacità di utilizzare un'ampia gamma di composti organici come fonte di carbonio. Il sistema è costituito da una piastra a 96 pozzetti di cui 95 contengono differenti fonti di carbonio e uno che non ne contiene alcuna, fungendo da controllo negativo.

Il profilo metabolico è stato ottenuto utilizzando il sistema automatizzato MicroLog secondo i protocolli forniti dalla ditta. Il batterio è stato fatto crescere su AND per 48 ore a 26°C e successivamente trasferito su substrato Biolog Universal Growth Agar (BUG<sup>™</sup>, Hayward, USA) per 24 ore a 28°C ai fini della preparazione dell'inoculo.

La torbidità delle sospensioni è stata misurata con un turbidimetro fornito dalla ditta (BIOLOG) e aggiustata fino ad un valore di T/Trasmittanza pari a 20±2 %. L'inoculo è stato trasferito in una vaschetta di plastica (Costar Corp., Cambridge, Mass.) e prelevato con una pipetta multicanale. I 96 pozzetti della micropiastra (GP2 MicroPlate) sono stati inoculati con aliquote della sospensione batterica (150 µl). Le piastre sono state poste ad incubare a 30°C.

I profili di ossidazione delle 95 fonti di carbonio, sono stati analizzati a diversi periodi di incubazione, tra 19 e 48 ore, mediante il BIOLOG MicroPlate reader alla

lunghezza d'onda di 590 nm. Il profilo del ceppo è stato analizzato con il software MicrologT che ne ha effettuato l'identificazione mediante confronto con le specie presenti in banca dati. L'output dell'identificazione consiste nell'indicazione della specie selezionata all'interno delle banche dati con il profilo metabolico più simile al ceppo in studio. Le altre specie della lista presentano gradi di similarità decrescenti.

L'identificazione Biolog è considerata accurata se: la lista nell'“ID box” contiene specie dello stesso genere; l'indice di similarità della prima specie in lista è  $\geq 0,5$ ; esiste una differenza di due punti nei valori di distanza tra le prime due specie della lista.

### 3. CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI FITOPLASMI

#### 3.1 Estrazione di acidi nucleici totali

Considerata l'osservazione di sintomi ascrivibili a fitoplasmi in specie vegetali, caratterizzate da tessuti vegetali a composizione differente (arbustive ed erbacee), si è reso necessario diversificare i metodi di estrazione degli acidi nucleici totali includenti il DNA fitoplasmale localizzato nei tessuti floematici.

Per l'estrazione sono stati impiegati due differenti protocolli, a seconda della matrice vegetale analizzata.

Tra i metodi disponibili, già validati per l'estrazione del DNA fitoplasmale, è stato prescelto il metodo di Cai e collaboratori (2001) (protocollo *Proteinasi K*) per le specie appartenenti al gruppo delle Cactaceae; per le altre specie vegetali, invece, è stato utilizzato il protocollo CTAB modificato da Marzachi e collaboratori (1999).

##### 3.1.1 Protocollo *Proteinasi K*

Il protocollo di Cai e collaboratori (2001) ha permesso di estrarre il DNA totale dalle cactaceae per le successive analisi tramite PCR.

Il materiale vegetale (1,5 g di tessuto floematico), privato di spine e dell'epidermide è stato omogeneizzato mediante l'uso di Polytron in 10 ml di GB (*Grinding Buffer*: 125 mM  $K_2HPO_4$ ; 125 mM  $KH_2PO_4$ ; 10% Saccarosio; 0,15% albumina di siero bovino; 2% Polyvinylpyrrolidone PVP-10). La miscela è stata centrifugata per 10 minuti a 10.000 rpm a 4°C e il surnatante filtrato su filtri Miracloth sterili e centrifugato a 14.000 rpm per 25 minuti a 4°C. Il pellet è stato risospeso in 3 ml di EB (*Extraction Buffer*: 0,25M NaCl; 0,1M EDTA pH8; 0,1M Tris-HCl pH8) con l'aggiunta di proteinasi K (100  $\mu$ g/ml); Il trattamento con l'enzima proteolitico Proteinasi K si rende necessario nell'analisi delle succulente, per eliminare le proteine dalle soluzioni di acido nucleico. Dopo incubazione a 55°C

per 60 minuti, alla sospensione è stato aggiunto un volume di fenolo, seguito da centrifugazione a 3000 rpm per 10 minuti. Al surnatante è stato addizionato mezzo volume di fenolo e mezzo volume di cloroformio/alcol isoamilico (24:1) mescolando per inversione. Dopo centrifugazione a 3000 rpm per 10 minuti, sono seguiti due lavaggi con un volume di cloroformio/alcol isoamilico (24:1) e 0,9 volumi di isopropanolo freddo. In seguito a centrifugazione a 14000 rpm per 30 minuti, il pellet è stato risospeso in 3 ml di etanolo al 70% e messo ad incubare tutta la notte in camera fredda. Dopo centrifugazione a 14.000 rpm a 4°C per 5 minuti, il pellet è stato risospeso in 50 µl di acqua sterile.

### **3.1.2 Protocollo CTAB (Cetylmethyl ammonium bromide)**

Il DNA totale è stato estratto utilizzando il protocollo messo a punto da Marzachi e collaboratori (1999). Il metodo si basa sull'impiego del detergente CTAB (bromuro di esadeciltrimetilammonio) il quale, in presenza di alte temperature (circa 60°C) ed elevate concentrazioni saline, si lega agli acidi nucleici formando un complesso stabile e solubile in acqua.

Il DNA totale è stato estratto da organi della pianta mostranti malformazioni e/o sintomi ascrivibili a fitoplasmi, accuratamente lavati in acqua corrente prima dell'asportazione, mediante lama sterile, dei tessuti floematici.

Il materiale vegetale (1,5 g) è stato omogeneizzato in 7 ml di PGB pH7.6 (*Phytoplasma Grinding Buffer*: 50% saccarosio; 1,5% BSA - albumina di siero bovino); 10% Polyvinilpyrrolidone - PVP-10; 1M tampone fosfato; 0,6% acido ascorbico) precedentemente preparato e mantenuto in ghiaccio, utilizzando buste per estrazione "Bioreba" e un apparato Gugerli. Cinque millilitri di PGB sono stati aggiunti alla miscela in tubo da 25 ml, successivamente centrifugata per 20 min. a 18.000 rcf. Dopo eliminazione del surnatante, il pellet è stato risospeso in 2 ml di CTAB (2% CTAB; 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA e 100 mM Tris-HCl, pH8) preriscaldato a 60°C.

Dopo incubazione a 60°C per 15-60 minuti ed aggiunta di 1 ml di cloroformio/alcol isoamilico (24:1) e centrifugazione alla massima velocità per 5 minuti, al surnatante (950 µl) è stato aggiunto un volume di isopropanolo freddo. Dopo avere mescolato per inversione, i campioni sono stati centrifugati alla massima velocità per 15 minuti a 4°C. Scartato il surnatante, è stato effettuato un lavaggio del pellet con 800 µl di etanolo al 70%. La precipitazione degli acidi nucleici è stata ottenuta mediante incubazione tutta la notte a -20°C in 400 µl di TE (10 mM Tris-HCl pH8, 1mM EDTA), 40 µl di sodio acetato 3M e 1 ml di etanolo al 95%.

Dopo centrifugazione a 14.000 rpm per 15 minuti a 4°C, è stato effettuato un lavaggio con 800 µl di etanolo al 70%. Il pellet è stato risospeso in 50 µl di acqua sterile.

### 3.2 Diagnosi dei fitoplasmi tramite nested-PCR con primer universali

La distribuzione irregolare dei fitoplasmi all'interno del floema delle piante infette, la loro bassa concentrazione e le variazioni di concentrazione in base alla stagione e agli organi della pianta (Firrao *et al.*, 2005) costituiscono degli ostacoli per una diagnosi corretta ed efficiente. In quest'ottica, l'applicazione dell'analisi PCR ha costituito il passo principale nella diagnosi, nell'identificazione e nella classificazione dei fitoplasmi (Bertaccini, 2007).

L'analisi PCR mediante l'uso di coppie di primer universali, basati sulla sequenza dell'operone ribosomiale, consente una rapida diagnosi del DNA fitoplasmale. In particolare, le coppie di primer P1/P7 e P1/16S-SR (Deng & Hiruki, 1991; Smart *et al.* 1996a; Lee *et al.*, 2004a) amplificano rispettivamente due frammenti di 1784 bp e 1537 bp che includono, il primo tutti gli operoni rRNA [16S rRNA, spazio intergenico (IS) e 23S rRNA] del genoma fitoplasmale (Fig. 18 e Tab.2), il secondo solo l'operone 16S rRNA.

Le coppie di primer universali R16F2n/R2 (Lee *et al.*, 1993) ed fU5/rU3 (Lorenz *et al.*, 1995), che sono state disegnate internamente alla regione 16S rRNA e che amplificano rispettivamente due frammenti di 1239 bp e 876bp, vengono abitualmente usati in nested-PCR (Fig. 18 e Tab.2), allo scopo di incrementare la sensibilità della diagnosi.

Considerate le difficoltà caratterizzanti il rilevamento del DNA fitoplasmale in matrici vegetali differenti (bassa concentrazione e presenza di inibitori), in numerosi casi è stato necessario applicare, parallelamente, due pool di reagenti differenti, allo scopo di risolvere eventuali casi di falsi negativi.

Pertanto, in una prima fase, l'amplificazione di ciascun DNA totale è stata eseguita utilizzando la Taq DNA polymerase recombinant (Invitrogen Life Technologies) in un volume finale di 50 µl contenente: tampone di PCR 1X [20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl], dNTP 100 µM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, primer 0,35 µM ciascuno, Taq DNA polymerase 1 U (Invitrogen) e 2µl DNA totale.

Successivamente, al fine di migliorare l'efficienza della PCR, si è scelto di utilizzare la PCR Master Mix (Promega) [50 units/ml Taq DNA polymerase (pH 8.5), MgCl<sub>2</sub> 3 mM, dNTP 400 µM,]. La reazione è stata eseguita in un volume finale di 50 µl, contenente: 2 µl di DNA totale e 25 µl di PCR Master Mix, 2 µl di ciascun primer (10 µM).

Le reazioni di PCR diretta, con i primer P1/P7 e P1/16S-SR sono state eseguite in un amplificatore Gene Amp PCR system 9700 (PE Applied Biosystem) secondo il seguente programma: un ciclo di 5 minuti a 95°C, seguito da 12 cicli ciascuno di 30

secondi a 95°C, 30 secondi a 60°C, un minuto e 30 secondi a 72°C; seguito da 25 cicli ciascuno di 30 secondi a 95°C, 25 secondi alla temperatura di 54°C, un minuto e 30 secondi a 72 °C; per ultimo un ciclo di 5 minuti a 72°C.

I prodotti così ottenuti sono stati diluiti 1:40 con acqua deionizzata sterile e 2 µl sono stati impiegati come template nell'amplificazione indiretta (nested-PCR) con le coppie di primer R16F2n/R2 (Lee *et al.*, 1993) e fU5/rU3 (Lorenz *et al.*, 1995). I parametri utilizzati per le amplificazioni con i primer R16F2/R2 sono i seguenti: un ciclo di 4 minuti a 95°C; seguito da 9 cicli ciascuno di un minuto a 95°C, un minuto e 30 secondi a 58°C, un minuto e 20 secondi a 72°C; seguito da 25 cicli ciascuno di un minuto a 95°C, un minuto e 30 secondi a 50°C, un minuto e 20 secondi a 72°C; per ultimo un ciclo a 72°C per 5 minuti.

Per le amplificazioni con primer fU5/rU3 è stato, invece, utilizzato il seguente profilo: 3 minuti a 94°C; seguito da 35 cicli ciascuno di un minuto a 94°C, un minuto a 50°C, un minuto e quindici secondi a 72°C; seguiti da un'estensione finale di 72°C per 5 minuti.

I prodotti di PCR sono stati separati mediante elettroforesi 5,7 V cm<sup>-1</sup> in gel di agarosio 1% in tampone TBE 1X (Sambrook *et al.*, 1989).

Per l'analisi elettroforetica sono stati utilizzati 25-30 µl di prodotto PCR con 2,5 µl di tracciante (Nucleic Acid Sample Loading Buffer, 5X – Bio-Rad).

Gli ampliconi sono stati visualizzati mediante colorazione con SYBR<sup>®</sup> Safe<sup>™</sup> DNA Gel Stain (Invitrogen) ed illuminazione con radiazione trasmessa UV (360 nm) e le immagini digitalizzate in un transilluminatore ChemiDoc<sup>™</sup> EQ (Bio-Rad, Laboratories). La dimensione molecolare della banda di amplificazione è stata stimata confrontando la mobilità elettroforetica relativa rispetto a quella di bande a dimensione nota del marker di 100 bp - EZ Load 100 bp PCR Molecular Ruler, Bio-Rad.

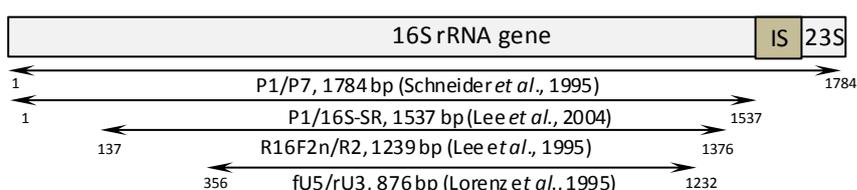


Fig. 18. Posizione sul genoma dei primer universali (P1/P7, R16F2n/R2, fU5/rU3) comunemente utilizzati per la diagnosi dei fitoplasmii.

Tabella 2. Sequenze di primer universali usate per amplificare l'operone 16S rRNA del fitoplasma

Primer	Sequenza (5' → 3')	Riferimento
P1	5'-AAGAGTTTGGATCCTGGCTCAGGATT-3'	Deng and Hiruki, 1991
P7	5'-CGTCCTTCATCGGCTCTT-3'	Smart <i>et al.</i> , 1996a
16S-SR	5'-GGTCTGTCAAACTGAAGATG-3'	Lee <i>et al.</i> , 2004
R16F2	5'-ACGACTGCTAAGACTGG-3'	Lee <i>et al.</i> , 1993
R16R2	5'-TGACGGGCGGTGTGTACAAACCCCG-3'	Lee <i>et al.</i> , 1993
fU5	5'-CGGCAATGGAGGAAACT-3'	Lorenz <i>et al.</i> , 1995

rU3	5'-TTCAGCTACTCTTTGTAACA-3'	Lorenz <i>et al.</i> , 1995
-----	----------------------------	-----------------------------

### 3.3 Primer gruppo specifici per il riconoscimento di fitoplasmi noti

In seguito a studi, mirati all'identificazione di fitoplasmi appartenenti al gruppo Stolbur (16SrXII), condotti su piante infestanti sintomatiche trovate in un vigneto in cui era stata già accertata la presenza di legno nero (16SrXII-A), si è deciso di utilizzare la coppia di primer gruppo-specifici R16(I)F1/R1 che amplifica un frammento di circa 800 bp (Lee *et al.*, 1994) (Tab.3).

Sul DNA totale dei campioni, risultati negativi alla nested-PCR con i primer R16F2n/R2 e positivi alla coppia di primer fU5/rU3, è stata utilizzata la coppia di primer specifici BGWL4f/r, disegnata da Tessitori e collaboratori (dati non pubblicati) per l'identificazione del Gruppo 16SrXIV. I primer, che amplificano un frammento di 300bp (Tab.3), erano stati disegnati e messi a punto, precedentemente, per saggiare piante di *Cynodon dactylon* affette dal fitoplasma Bermuda grass white leaf (BGWL).

Anche in questo caso, le reazioni di nested-PCR sono state eseguite in un amplificatore Gene Amp PCR system 9700 (PE Applied Biosystem).

Per le amplificazioni con i primer R16(I)F1/R1 è stato utilizzato lo stesso programma descritto precedentemente per i primer fU5/rU3.

Nel caso dei primer BGWL4f/r, invece, sono stati impostati i seguenti parametri: un ciclo di cinque minuti a 94°C; seguito da 35 cicli ciascuno di un minuto a 94°C, due minuti a 52°C, tre minuti a 72°C; per ultimo un ciclo a 72°C per dieci minuti.

L'analisi dei prodotti di PCR è stata effettuata, come descritto precedentemente, mediante elettroforesi in gel d'agarosio.

Tabella 3. Sequenze di primer specifici per il Gruppo 16SrXII e Gruppo 16SrXIV

Primer	Sequenza (5' → 3')	Riferimento
R16(I)F1	5'-TAAAAGACCTAGCAATAGG-3'	Lee <i>et al.</i> , 1994
R16(I)R1	5'-CAATCCGAAGTACTGACTGT-3'	Lee <i>et al.</i> , 1994
BGWL4f	5'-CGGGAATTCGATTAGAGTTTTGA-3'	Tessitori (dati non pubblicati)
BGWL4r	5'-AACTCTAGTCCAGCTACACA-3'	Tessitori. (dati non pubblicati)

### 3.4 Purificazione del DNA dopo reazioni di PCR

Allo scopo di ottenere la singola banda delle dimensioni attese (1239 bp), corrispondente al 16S rRNA fitoplasmale, ed eliminare eventuali ampliconi aspecifici, tracce di primer, sali ed enzimi dei prodotti di PCR, si è reso necessario purificare i prodotti PCR per il buon esito degli esperimenti successivi all'amplificazione (clonaggio, sequenziamento, analisi di restrizione, ecc.).

Gli ampliconi sono stati isolati utilizzando il kit di purificazione fornito dalla GE Healthcare (GFX™ PCR and Gel Band Purification Kit).

Il Kit consente la purificazione rapida di frammenti di DNA direttamente da gel di agarosio. Il DNA, una volta eluito, risulta privo di agarosio o altre impurità ed è compatibile per la digestione con enzimi di restrizione, per ligazioni in vettori di clonaggio e per il sequenziamento.

La tecnologia di purificazione del GFX™ PCR and Gel Band Purification Kit si basa sulla cromatografia mediante colonnine utilizzando una resina a scambio ionico come matrice di separazione. La resina lega il DNA in presenza di un'elevata concentrazione di sali e a pH acido e rilascia il DNA legato in presenza di una bassa concentrazione di sali e di condizioni leggermente alcaline. Il DNA di interesse è stato separato mediante elettroforesi in gel di agarosio e la banda ottenuta è stata escissa dal gel mediante un bisturi. Al tassello di gel, trasferito in una microprovetta, è stata aggiunta la soluzione *Capture Buffer* (10 µl per ogni 10 mg di gel) ed è seguita una incubazione a 60°C fino al completo scioglimento del gel.

Il *capture buffer* contiene sali caotropici i quali sono utilizzati sia per far sciogliere l'agarosio sia per consentire il legame reversibile del DNA alla matrice della colonnina. Il campione contenente il DNA e l'agarosio fuso viene quindi applicato all'interno di una colonnina e centrifugato. La resina lega il DNA in un modo dipendente dalla concentrazione ionica, pertanto il DNA si legherà alla resina mentre l'agarosio e tutte le altre impurità verranno eliminate nell'eluito. Segue un lavaggio con la soluzione *Wash Buffer* (Tris-EDTA addizionato con etanolo assoluto) per rimuovere tutte le impurità rimanenti, ed, infine, l'eluizione con l'*Eluite Buffer* (TE, Tris-HCl).

Al fine di valutare la purezza dei frammenti amplificati si è effettuata una corsa elettroforetica in gel di agarosio al 1% utilizzando 5µl di ogni campione e il marker Precision Molecular Mass Ruler (Bio–Rad) a concentrazioni note.

### 3.5 Reazione di ligazione in vettore plasmidico e clonaggio

L'ottenimento di quantità differenti di DNA, da sottoporre al sequenziamento, necessita di una fase di trasformazione e clonaggio.

Per la reazione di ligazione del DNA al vettore plasmidico e successiva trasformazione e clonaggio in cellule di *Escherichia coli* è stato utilizzato il kit pGEM®-T Easy Vector System (Promega Corp., Madison, WI) (Fig.19). La reazione di ligazione consente di saldare le estremità di un plasmide a quelle di un frammento lineare di DNA, grazie all'attività dell'enzima DNA ligasi, rendendo così possibile il clonaggio dei frammenti di DNA all'interno di vettori plasmidici. La reazione di ligazione è stata realizzata in un volume finale di 10 µl, contenente Buffer di

ligazione T4 DNA 1X, 50 ng del vettore pGEM<sup>®</sup>-T Easy, ~ 15 ng di prodotto PCR e 3 U di T4 DNA Ligase, posto in incubazione alla temperatura di 4°C per una notte.

Il plasmide ricombinante è stato utilizzato per trasformare cellule di *Escherichia coli* ( $1 \times 10^8$  cfu/ $\mu$ g DNA) del ceppo JM109 (cellule competenti).

Per la trasformazione, 50  $\mu$ l di cellule batteriche competenti sono state miscelate alla reazione di ligazione. La miscela è stata posta in ghiaccio per 20 minuti, successivamente a 42°C per 60 secondi e nuovamente in ghiaccio per 2 minuti, e, dopo aver aggiunto 950  $\mu$ l di SOC medium sterile, è stata posta in agitazione a 37°C per un'ora e 50 minuti. La soluzione è stata quindi centrifugata per 10 minuti alla velocità di 1.000 giri per minuto in una centrifuga da banco; ciò ha consentito di eliminare gran parte del surnatante e di risospingere il pellet nel surnatante residuo (200  $\mu$ l). La miscela è stata dispensata omogeneamente in capsule di Petri sterili su LB, gelificato con agar, contenente ampicillina (100 $\mu$ g/ml). Su tale mezzo erano stati previamente dispensati 100  $\mu$ l di Isopropil-D-1-thiogalactopiranoside (IPTG) alla concentrazione di 100 mM e 20  $\mu$ l di 5-Br-4-Cl-3-indogalactopiranoside (X-Gal) alla concentrazione di 50 mg/ml e lasciato assorbire per 30 minuti a 37°C.

Le capsule Petri sono state incubate a 37°C per una notte.

La selezione delle colonie è stata eseguita con il metodo della distinzione blu-bianco: nel plasmide è, infatti, presente il gene *lacZ* che codifica per la  $\beta$ -galattosidasi, un enzima che scinde la molecola di X-Gal in due molecole di cui una è di colore blu. L'IPTG agisce sul promotore del gene inducendo la sintesi della  $\beta$ -galattosidasi. Durante il clonaggio il frammento si inserisce nella regione *lacZ* impedendo la sintesi dell'enzima. Le cellule che contengono l'inserito non sono in grado di scindere X-Gal presente nel substrato, quindi saranno di colore bianco; mentre quelle prive dell'inserito metabolizzano X-gal colorandosi di blu.

Tra le colonie di *E. coli* trasformate ne sono state selezionate alcune tra quelle non esprimenti il gene della  $\beta$ -galattosidasi (*lacZ*), quindi di colore bianco, che sono state trasferite in una nuova piastra LB/Agar/Amp con supporto numerato allo scopo di catalogare i cloni da sottoporre a sequenziamento. I cloni sono mantenuti in glicerolo a -80° C.

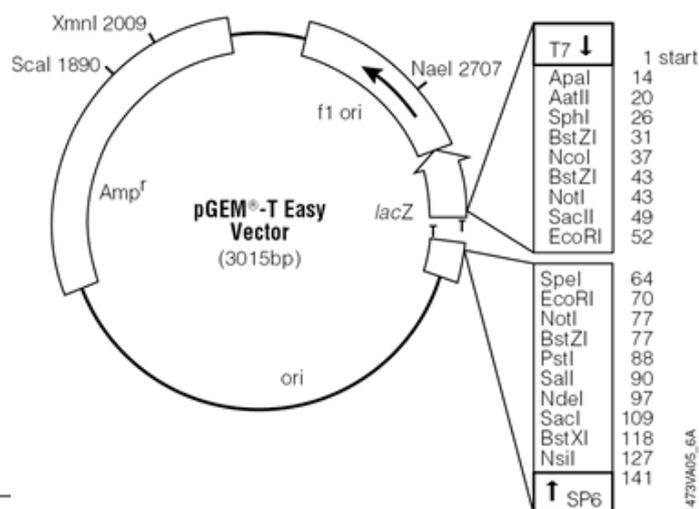


Fig. 19. Rappresentazione grafica del plasmide pGEM-T Easy (Promega).

### 3.6 Isolamento del DNA plasmidico

Cinque colonie del plasmide ricombinante, ottenuto tramite coltura delle cellule di *E. coli*, sono state utilizzate per inoculare 10 ml di brodo LB + ampicillina (50 µg/ml), posti ad incubare tutta la notte a 37° C ad agitazione costante (250 rpm) (Sambrook *et al.*, 1989).

Per l'estrazione del plasmide e la purificazione dell'inserto è stato utilizzato il kit Manual FastPlasmid™ Mini Kit (5 PRIME). Il protocollo seguito è quello indicato dalla casa produttrice del kit di estrazione: dopo centrifugazione di 1,5 ml di coltura batterica a 13.000 rpm, al pellet vengono aggiunti 400 µl di Ice-Cold ed incubazione per 10 minuti a temperatura ambiente. La soluzione contiene enzimi e detergenti che lisano le cellule batteriche, denaturano e solubilizzano i componenti cellulari, degradano l'RNA e intrappolano il DNA in una matrice. La soluzione è stata aggiunta al pellet alla temperatura di 4°C e agitata con vortex per 30 secondi. Questo processo, oltre a risospendere il pellet, consente che i detriti cellulari siano degradati dagli enzimi e dai detergenti.

La sospensione cellulare è stata incubata per tre minuti a temperatura ambiente e trasferita nella colonna MiniSpin fornita dal Kit.

Il DNA plasmidico, lavato con un Buffer (Dilute Wash Buffer) a base di alcool per rimuovere ulteriori impurità, è stato centrifugato per un minuto alla massima velocità e, infine, risospeso in un buffer a bassa concentrazione di sali (Elution Buffer: 10mM Tris-Cl, 0,1 mM EDTA, pH 8.5).

Al fine di avere un'ulteriore conferma dell'avvenuta trasformazione del frammento d'interesse, il DNA plasmidico, dopo l'estrazione, è stato sottoposto ad una reazione di digestione enzimatica tramite enzimi di restrizione facenti parte del gruppo delle endonucleasi. Fra le endonucleasi disponibili sono state scelte quelle che riconoscono un solo sito di taglio all'interno del gene inserito e uno all'interno del vettore plasmidico.

E' stata, pertanto, effettuata la restrizione enzimatica dei prodotti di amplificazione ottenuti con la coppia di primer R16F2n/R2 mediante l'endonucleasi *EcoRI* (Fig19).

Per la reazione sono state seguite le indicazioni della ditta produttrice (Promega); in un volume finale di 10 µl sono stati digeriti 1 µl di DNA con 2 µl di RE 10X Buffer, 0,2 µl di Acetylated-BSA (10 µg/µl) e 0,5 µl di enzima di restrizione. La reazione è stata lasciata in incubazione per 2 ore a 37 °C e i frammenti di restrizione sono stati poi separati e visualizzati mediante elettroforesi a 5,7 V cm<sup>-1</sup> in gel di agarosio 1% in tampone TBE 1X, secondo le modalità descritte sopra.

### 3.7 Sequenziamento del 16S rRNA fitoplasmale

Il DNA plasmidico, incluso l'inserto del DNA fitoplasmale ottenuto tramite PCR, è stato sequenziato, tramite metodo enzimatico (Sanger *et al.*, 1977), presso i laboratori BMR Genomics s.r.l. (Padova) che utilizzano i sequenziatori ABI 3730XL e ABI 3100. La capacità di lettura delle sequenze si aggira intorno ad una lunghezza massima di 700-900 nucleotidi ed è sempre necessario il controllo dell'elettroferogramma, allo scopo di confermare i dati di output della lettura automatica dello strumento.

Nel caso di prodotti di PCR per cui è stato necessario, viste le dimensioni del frammento (>1200 bp per i primer R16F2n/R2), effettuare il clonaggio nel plasmide pGEM-T Easy, sono stati utilizzati, come primer di inizio lettura, i due siti del plasmide esterni al frammento clonato, denominati M13 Forward ed M13 Reverse.

Per quanto riguarda gli ampliconi ottenuti con i primer universali fU5/rU3 (876 bp) si è proceduto al sequenziamento diretto del prodotto di PCR utilizzando come primer di sequenziamento gli stessi utilizzati per la reazione di amplificazione.

Considerato che la capacità di lettura delle sequenze si aggira intorno ai 700-900 nucleotidi, è sempre stato necessario effettuare il sequenziamento in entrambe le direzioni di lettura (5'→3' e 3'→5') utilizzando come innesco della reazione di sequenziamento entrambi i primers reverse e forward. La sequenza reverse ottenuta (3'→5') è stata convertita tramite il programma online "Reverse complement" ([http://www.bioinformatics.org/sms/rev\\_comp.html](http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html)) e allineata (con Clustal W) con quella forward per ricostruire il prodotto finale 5'→3'. Nel caso di sequenze ottenute previo clonaggio, è stato necessario "ripulirle" allo scopo di eliminare eventuali contaminazioni di DNA del vettore plasmidico. L'eliminazione delle sequenze appartenenti al vettore è stata effettuata manualmente, individuando, sulle sequenze ottenute, i primers utilizzati, e sottraendo la parte a monte della sequenza forward e quella a valle della sequenza reverse.

### 3.8 Analisi bioinformatica dei dati di sequenza

Tutte le sequenze esaminate e ricostituite sono state analizzate, tramite ulteriori strumenti di bioinformatica, per la loro classificazione e per lo studio della loro identità o variabilità rispetto a fitoplasmi già noti. In particolare, sono state effettuate le seguenti analisi:

- le analisi sulla similarità tra le singole sequenze ottenute e ricostituite (query) e quelle già depositate nelle banche dati sono state effettuate mediante il programma BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), disponibile sul sito del National Centre for Biotechnology Information ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)) (Zheng *et*

al., 2000), consultando i vari database di sequenze depositate in GeneBank. La prima fase di BLAST consiste nella creazione di una lista di parole di  $W$  lettere ( $W$ -mers) affini a tutti i possibili  $W$ -mers presenti nella sequenza query.

L'affinità è misurata in base ai punteggi di una matrice di sostituzione. Una volta completata la lista, BLAST cerca corrispondenze esatte (hits) dei  $W$ -mers nelle sequenze della banca dati. Ogni volta che un hit viene identificato il programma verifica quanto sia possibile estenderlo e se il risultante HSP (*High-scoring Segment Pair*) sia superiore a una soglia di attenzione definita dal parametro  $S$  che stabilisce una soglia di score, sopra la quale un HSP viene ritenuto degno di attenzione.

- gli allineamenti multipli (confronti di query ottenute da gruppi di piante affini o tra query e sequenze type del *Candidatus* Phytoplasma di riferimento) sono stati effettuati mediante l'utilizzo del programma CLUSTALW (EMBL-EBI, European Bioinformatics Institute) sul sito [www.ebi.ac.uk.com](http://www.ebi.ac.uk.com).

L'algoritmo utilizzato è un metodo euristico che si basa sull'allineamento progressivo e sull'ipotesi che le sequenze da allineare siano filogeneticamente correlate. Nella prima fase vengono allineate tutte le possibili coppie di sequenza. I punteggi di similarità così ottenuti vengono utilizzati per costruire un albero filogenetico o dendrogramma che servirà da guida per formare cluster di due o più sequenze da allineare ad altri cluster o a sequenze singole.

- gli allineamenti globali, da effettuare tra due sequenze di dimensioni quasi identiche, sono stati effettuati utilizzando l'algoritmo di Needleman & Wunsch (1970) mediante il software *needle* del pacchetto software di EMBL-EBI, visualizzando i risultati in formato output markx2.

- gli allineamenti locali, necessari nella comparazione di sequenze di dimensioni diverse, sono stati effettuati utilizzando l'algoritmo di Smith & Watermann (1981) con il software *Lalign* del pacchetto software di EMBL-EBI.

Al termine di tali analisi, che consentono di stabilire l'identità dei fitoplasmi, le sequenze del gene 16S rRNA F2nR2, nominate in base alla pianta ospite e al sintomo principale, sono state depositate in GenBank, utilizzando il software Sequin, uno strumento sviluppato da NCBI e disponibile online (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Sequin/>), per inserire nuove sequenze o per aggiornare quelle già presenti in banca dati.

### 3.9 RFLP virtuali

Considerata l'impossibilità di coltivare i fitoplasmi su substrati artificiali e, quindi, di non poterli caratterizzare dal punto di vista fenotipico, la classificazione dei fitoplasmi è tutt'oggi effettuata tramite analisi RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) dei prodotti di PCR dell'operone 16S rRNA (gene altamente conservato tra i fitoplasmi) accoppiata all'analisi della sequenza nucleotidica dello stesso. L'analisi del polimorfismo dei frammenti di restrizione del 16S rRNA ha

rappresentato un utile strumento per la classificazione dei fitoplasmi in un sistema di gruppi e sottogruppi (Lee *et al.*, 2000). L'analisi RFLP viene effettuata tramite digestione enzimatica dell'amplicone, ottenuto con i primer universali R16F2n/R2, con un set di enzimi di restrizione, in grado di tagliare il DNA in siti di riconoscimento specifici per ogni enzima, denominati siti di restrizione.

Il prodotto della digestione enzimatica di una molecola di DNA, tramite i suddetti enzimi di restrizione, produce un insieme di frammenti che, visualizzati su gel di poliacrilammide, rappresentano il "profilo" del DNA in analisi. Nel caso degli RFLP applicati alla classificazione dei fitoplasmi, il DNA, ottenuto dai prodotti di PCR, viene digerito con ogni singolo enzima ed il profilo che ne deriva viene comparato con quello ottenuto per i ceppi tipo di ogni gruppo, consentendo la determinazione del gruppo e del sottogruppo per il DNA in esame. Per effettuare tale analisi, oltre a richiedere tempi abbastanza lunghi (differenti campioni/controlli e differenti enzimi), è necessario disporre di tutti i ceppi tipo dei differenti fitoplasmi (da mantenere in vivo su Pervinca).

Per ovviare a tali problemi, di recente è stato messo a punto un metodo alternativo agli RFLP convenzionali, rappresentato da analisi RFLP virtuali.

Mimando la digestione con gli enzimi di restrizione condotta in laboratorio ed i successivi gel elettroforetici, l'analisi del 16S rRNA simulata al computer produce profili RFLP virtuali, consentendo la differenziazione e l'identificazione dei ceppi dei fitoplasmi.

Come risultato, il sistema di classificazione dei fitoplasmi, in base agli RFLP virtuali, è stato ampliato a 30 gruppi e più di 100 sottogruppi (Zaho *et al.*, 2010; Wei *et al.*, 2008).

La classificazione dei fitoplasmi, rilevati nel materiale vegetale in analisi, è stata, quindi, effettuata analizzando le sequenze del 16S rRNA tramite RFLP virtuali utilizzando il programma *iPhyClassifier* disponibile online (<http://plantpathology.ba.ars.usda.gov/cgi-bin/resource/iphyclassifier.cgi>) (Zaho *et al.*, 2009).

*iPhyClassifier* contiene tre moduli di programma: un modulo (PM1) per la ricerca di similarità di sequenza ed il calcolo del coefficiente di similarità degli appaiamenti, uno per il calcolo dei siti di taglio e di analisi degli RFLP virtuali (PM2) ed un ultimo per l'elaborazione grafica di immagini di elettroforesi virtuali (PM3). L'operazione online inizia con l'inserimento, da parte dell'utente, della sequenza query (sequenza in studio) in formato FASTA, nella pagina web (Fig. 20A).

La prima fase consiste nel confronto tra la sequenza query e le sequenze presenti nella banca dati, al fine di identificare rapidamente quelle vicine filogeneticamente (modulo PM1). In questa fase viene usato l'algoritmo di BLAST. Se nessuna specie di fitoplasma appare tra i primi 50 risultati ottenuti dalla ricerca BLAST, oppure si ottiene una similarità  $\leq 91\%$ , il programma interrompe l'operazione, avvertendo che la sequenza query probabilmente non rappresenta quella di un fitoplasma. Se invece nella lista compare un '*Ca. Phytoplasma*' e la ricerca su BLAST fornisce una

similarità  $\geq 92\%$ , la sequenza query verrà inserita nel programma CLUSTALW per l'allineamento multiplo di sequenza con tutte le sequenze di fitoplasmi inserite nel database specifico di *iPhyClassifier* (DB1Phy) che contiene tutte le sequenze 16S rRNA dei ceppi formalmente descritti come specie '*Ca. Phytoplasma*', per il calcolo della similarità di sequenza.

Nella seconda fase dell'operazione (modulo PM2) da ogni sequenza query (se di taglia superiore) viene tagliata la regione completa F2nR2 utilizzando espressioni regolari che corrispondono alla coppia di primer R16F2n/R2.

Viene, quindi, simulata la digestione *in silico* di ogni frammento F2nR2, precedentemente ottenuto, con 17 distinti enzimi di restrizione: *AluI*, *BamHI*, *BfaI*, *BstUI* (*ThaI*), *DraI*, *EcoRI*, *HaeIII*, *HhaI*, *Hinfi*, *HpaI*, *HpaII*, *KpnI*, *Sau3AI* (*MboI*), *MseI*, *RsaI*, *SspI* e *TaqI* (Lee *et al.*, 1998).

I frammenti prodotti dalla digestione *in silico* vengono comparati con i profili derivanti dal secondo database (DB2iPhy), che contiene i frammenti F2nR2 dei ceppi type di ciascun gruppo e sottogruppo, e viene calcolato il coefficiente di similarità ( $F$ ) con le sequenze type, in accordo con la formula  $F = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$ , nella quale  $x$  e  $y$  sono i due ceppi oggetto di studio (Nei & Lee, 1979);  $N_x$  ed  $N_y$  sono il numero totale di frammenti, ottenuti dalla digestione con i 17 enzimi, dei ceppi  $x$  ed  $y$  rispettivamente;  $N_{xy}$  rappresenta il numero di frammenti condivisi dai due ceppi, quello in esame e quello type.

Due fitoplasmi (quello in esame e il type per l'assegnazione di gruppo e sottogruppo) sono ritenuti identici se sono costituiti dallo stesso numero di basi, con una tolleranza variabile da 0 a 6 basi di differenza (deviation), parametro che viene stabilito dall'operatore. Tutti i frammenti generati, di dimensioni inferiori a 50 bp, non vengono considerati, in accordo con quanto avviene con le analisi RFLP convenzionali.

Successivamente, il software genera tre file di output: *pattern\_comparison\_result*, dove sono annotati i valori di  $N_x$ ,  $N_y$ ,  $N_{xy}$  ed  $F$  per singolo enzima; *pattern\_comparison\_detail*, dove sono annotati i risultati di  $N_x$ ,  $N_y$ ,  $N_{xy}$  per singolo enzima; *similarity\_coefficient\_display*, che mostra una matrice dei coefficienti di similarità calcolati per tutte le coppie di ceppi (Fig. 20B).

Contestualmente al calcolo del coefficiente di similarità, *iPhyClassifier* trasforma il profilo RFLP ottenuto in un'immagine virtuale (PM3) su gel di agarosio al 3% convertendo l'informazione di sequenza in un dato "visivamente" accessibile per la differenziazione e classificazione dei fitoplasmi (Fig. 20C).

*iPhyClassifier* implementa il criterio proposto da Wei e collaboratori (2008), settando 0.97, come valore soglia del coefficiente di similarità, per l'identificazione di un nuovo sottogruppo all'interno di un dato gruppo. L'adozione di tale valore è garantita in quanto riflette con precisione lo schema di classificazione dei sottogruppi già esistente, nel quale anche una sola differenza nei siti di restrizione può distinguere un nuovo sottogruppo.

Un coefficiente di similarità  $\leq 0.85$ , calcolato su tutti i sottogruppi precedentemente rilevati, indica che il ceppo oggetto di studio potrebbe rappresentare un nuovo gruppo 16Sr, in accordo con tutti i gruppi precedentemente descritti.

Profili RFLP con coefficiente di similarità di 0.99 e 0.98 rispetto al profilo del ceppo tipo o di un membro di riferimento di un dato sottogruppo sono considerate varianti dello stesso (Zaho *et al.*, 2009b).

Queste varianti vengono indicate con uno e due asterischi, rispettivamente (\* o \*\*), dopo la lettera del corrispondente sottogruppo, come per esempio 16SrI-A\* ( $F=0.99$ ) e 16SrI-A\*\* ( $F=0.98$ ) (Wey *et al.*, 2008). Dato che i valori dei coefficienti di similarità sono influenzati sia dal numero sia dal set di enzimi di restrizione, selezionati per le analisi RFLP, il valore soglia del coefficiente di similarità per la delimitazione di un nuovo gruppo e sottogruppo è strettamente basato sull'uso di un set specifico di diciassette enzimi di restrizione, originariamente stabilito per la classificazione dei fitoplasmia (Lee *et al.*, 1998).

Dato che l'operazione con *iPhyClassifier* dipende unicamente dalle sequenze inserite, qualunque errore nella sequenza query del ceppo oggetto di studio (errori causati da: analisi PCR, clonaggio, sequenziamento) potrebbe portare ad un'erronea classificazione gruppo/sottogruppo ed assegnazione della specie '*Ca. Phytoplasma*'.

Per tale motivo gli autori suggeriscono, in linea generale, di sequenziare e sottoporre ad analisi RFLP virtuale, o due isolati dello stesso fitoplasma (es. estratto da due piante differenti) o, nel caso in cui si abbia solo un isolato, due cloni diversi ottenuti dallo stesso DNA ma da due reazioni PCR diverse (Zaho *et al.*, 2009b).

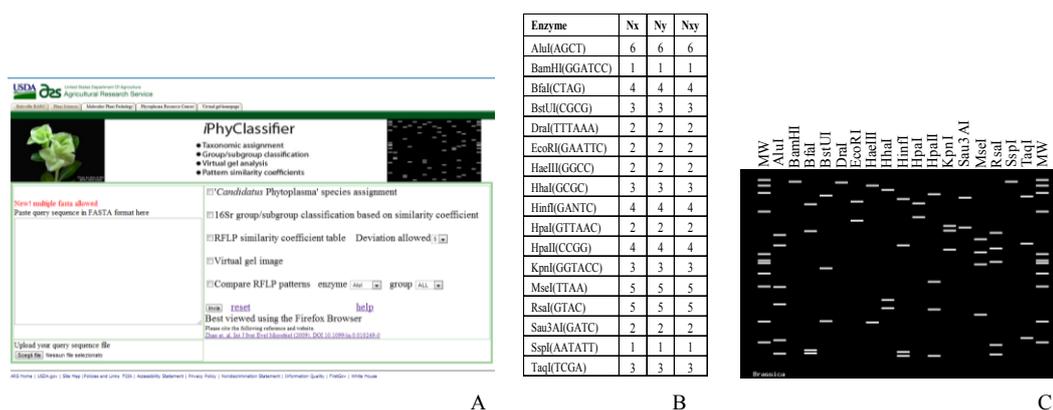


Fig. 20. A) Schermata della pagina web di *iPhyClassifier*; B) File prodotto dalla comparazione dei profili RFLP; C) Immagine di un profilo RFLP virtuale R16F2nR2.

#### 4. RICERCA DEL GENE DI PATOGENICITÀ TENGU

Vista la recente scoperta del gene di patogenicità TENGU (213 bp), riportato in genomi di fitoplasmi del gruppo dell'Aster yellows (AY) (16SrI) che determinano sintomi di scopazzi, e ritenuto, al momento, responsabile dell'induzione di squilibri ormonali (Hoshi *et al.*, 2009), si è deciso di determinare la sua presenza nelle piante in studio.

##### 4.1 Primer specifici per il rilevamento del gene TENGU

I campioni provenienti da piante mostranti sintomi di scopazzi e/o fasciazioni, precedentemente analizzate e risultate positive alla presenza di fitoplasmi, appartenenti al gruppo 16SrI, sono stati sottoposti ad analisi PCR utilizzando due differenti coppie di primer. Tali coppie di primer, allo scopo di testarne la specificità, sono state inizialmente provate su diversi controlli positivi, European aster yellow (EAY), Chrysanthemum yellow (CY), American aster yellow (AAY), Primula yellow (PY), Lettuce yellow (LY), Gladiolus yellow (Gl), tutti fitoplasmi appartenenti al gruppo 16SrI, forniti dalla dott.ssa Cristina Marzachi e mantenuti in collezione in piante indicatrici di pervinca, presso il CNR di Torino.

Alle analisi sono stati, inoltre, aggiunti due controlli negativi; il primo rappresentato dal fitoplasma Elm yellow (EY) appartenente al gruppo (V-C), fornito anch'esso dalla dott.ssa Marzachi, il secondo, invece, era un campione di *Rumex bucephalophorus* asintomatico e risultato negativo alla presenza di fitoplasmi.

La prima coppia di primer, tenguf (5'-AATCATATAAAGAAAGCAGGT TATA-3', omologo) e tengur (5'-TATGTTGTTACTGCATTACTAATTGC-3', complementare) è stata reperita in GenBank tra le informazioni della sequenza del gene TENGU depositata (JF923816.1) da Song e collaboratori (dati non pubblicati, 2011), e amplifica un prodotto, contenente il gene TENGU, di 299 bp.

Una seconda coppia di primer è stata appositamente disegnata al fine di testare l'efficienza dei primer prima descritti, per il rilevamento del gene TENGU, in specie di fitoplasmi diverse da AY. La nuova coppia di primer è stata disegnata utilizzando il software "Primer3" disponibile online alla pagina <http://fokker.wi.mit.edu/primer3/> (Rozen e Skaletsky, 2000), a partire da un allineamento multiplo di tutte le sequenze TENGU presenti in GenBank.

La nuova coppia di primers, composta da un primer specifico tengurspec (5'-TAGGCATCTTTCTCGCCCTTT-3', complementare) ed uno degenerato tenguf4d (5'- TCNAAAAANATAAAGNAAAANT-3'), con quattro posizioni di degenerazione, amplifica un frammento di 202 bp. La scelta di disegnare un primer degenerato deriva dal fatto che il gene, proveniendo da fitoplasmi differenti, avrebbe potuto mostrare una certa variabilità. Nonostante la temperatura di annealing ( $T_a$ ) calcolata  $[(T_{m_{rev}} + T_{m_{for}})/2 - 5^\circ\text{C}]$  per le due coppie di primer fosse, rispettivamente,

di 55°C per i primer tenguf e tengur e di 53°C per i primer tenguf4d e tengurspec, per le successive reazioni di PCR è stata scelta la temperatura di annealing di 50°C, allo scopo di abbassare le condizioni di “stringenza” della reazione e riuscire a rilevare il gene anche in diverse condizioni di variabilità.

Come descritto in precedenza, le reazioni di PCR sono state condotte in un volume finale di 50 µl aggiungendo a 25 µl della PCR Master Mix (Promega) 2 µl di DNA e 0,4 µM di ciascun oligonucleotide. Per l’amplificazione sono stati utilizzati i seguenti parametri: denaturazione iniziale a 94 °C per 5 minuti, seguito da 35 cicli ciascuno di un minuto a 94°C, un minuto a 50°C, un minuto a 72°C, per ultimo un ciclo a 72°C per 7 minuti.

Anche in questo caso, il peso molecolare degli ampliconi è stato stimato confrontando la mobilità elettroforetica relativa rispetto a quella di bande a dimensione nota del marker di precisione Precision Molecular Mass Ruler (Bio-Rad).

## 4.2 Clonaggio e sequenziamento

Due degli ampliconi ottenuti, uno per ciascuna coppia di primer utilizzata, sono stati clonati per poi procedere al sequenziamento, al fine di accertare l’identità del gene e così valutare la specificità dei primer utilizzati. Allo scopo di clonare il frammento di DNA target, prima di procedere al clonaggio, 30 µl di prodotto amplificato sono stati eluiti con GFX<sup>TM</sup> PCR and Gel Band Purification Kit, secondo il protocollo fornito dal produttore, e quantificato, su gel d’agarosio 1%, utilizzando 5 µl di ogni campione e il marker Precision Molecular Mass Ruler a concentrazione nota.

Per la reazione di ligazione del DNA al vettore plasmidico e successiva trasformazione e clonaggio in *Escherichia coli* è stato utilizzato il kit pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector System, lo stesso utilizzato per i fitoplasmi.

Il DNA plasmidico contenente l’inserto bersaglio è stato sequenziato tramite metodo enzimatico presso i laboratori BMR Genomics (Padova) e le sequenze ottenute comparate a quelle già depositate in GenBank o ottenute da altri ricercatori che stanno lavorando sullo stesso argomento (comunicazioni personali).

## RISULTATI

## 1. MATERIALE VEGETALE

A seguito di escursioni sia all'interno che all'esterno di aree protette ed aree coltivate del territorio siciliano, e grazie a segnalazioni pervenute al nostro dipartimento, sono state riscontrate manifestazioni teratologiche o sindromi ascrivibili a procarioti agenti causali di modificazioni di forma su 36 specie vegetali appartenenti a 27 generi di 16 famiglie (Tab. 4).

I sintomi di modificazione e forma registrati con maggiore frequenza sono stati: fasciazioni totali o settoriali dello scapo, scopazzi, accorciamento degli internodi, clorosi e virescenza.

Tutti i dati su sintomi, frequenza delle piante sintomatiche, segnalazione del sito, documentazione fotografica, ecc., sono state registrate sulle schede teratologiche implementate predisposte (Appendice I).

Tabella 4. Elenco sistematico

Elenco sistematico	
<b>AMARANTHACEAE</b>	<b>FABACEAE</b>
<i>Celosia crestatata</i> L.	<i>Genista aetnensis</i> (Raf. Ex Biv.) DC.
<i>Celosia plumosa</i> Hort. ex Burvenich	<i>Pararchidendron pruinosum</i> (Benth.) I.C. Nielsen
<i>Chenopodium album</i> L.	<i>Sophora secundiflora</i> (Gomez-Ortega) Lag. ex DC.
<b>ASTERACEAE</b>	<i>Spartium junceum</i> L.
<i>Carlina gummifera</i> (L.) Less.	<b>OLEACEAE</b>
<i>Erigeron bonariensis</i> hort. ex Link	<i>Jasminum sambac</i> (L.) Aiton
<i>Picris echioides</i> L.	<b>PHYTOLACCACEAE</b>
<b>BORAGINACEAE</b>	<i>Phytolacca dioica</i> L.
<i>Echium plantagineum</i> L.	<b>POACEAE</b>
<i>Echium vulgare</i> L.	<i>Cynodon dactylon</i> (L.) Pers.
<b>BRASSICACEAE</b>	<b>POLYGONACEAE</b>
<i>Brassica oleracea</i> L. subsp. <i>botrytis</i> (L.) Metzg.	<i>Rumex bucephalophorus</i> L. subsp. <i>bucephalophorus</i>
<i>Brassica rapa</i> L.	<b>ROSACEAE</b>
<b>CACTACEAE</b>	<i>Prunus dulcis</i> (Mill.) D.A. Webb 'Ferragnes'
<i>Austocylindropuntia exaltata</i> (A. Berger) Backeb. "monstruosa"	<b>SCROPHULARIACEAE</b>
<i>Opuntia cylindrica</i> (Lam.) DC. "monstruosa"	<i>Bellardia trixago</i> (L.) All.
<i>Opuntia ficus-indica</i> (L.) Mill.	<i>Linaria heterophylla</i> Desf.
<i>Opuntia subulata</i> Engelm. "monstruosa"	<i>Linaria purpurea</i> (L.) Mill.
<i>Pereskia grandifolia</i> Haw.	<i>Scrophularia canina</i> subsp. <i>bicolor</i> (Sm.) Greuter
<b>CONVOLVULACEAE</b>	<i>Verbascum thapsus</i> L.
<i>Convolvulus arvensis</i> L.	<b>VALERIANACEAE</b>
<b>EUPHORBIACEAE</b>	<i>Fedia cornucopiae</i> (L.) Gaertner
<i>Euphorbia characias</i> L.	<b>VITACEAE</b>
<i>Euphorbia dendroides</i> L.	<i>Vitis vinifera</i> L. cv. Chardonnay
<i>Euphorbia linifolia</i> L.	
<i>Euphorbia myrsinites</i> L.	

All'interno della famiglia Amaranthaceae sono stati osservati casi teratologici su tre differenti specie: *Celosia crestata*, *C. plumosa*, *Chenopodium album*.

Otto piante di *C. crestata* ottenute da seme e analizzate presso il nostro laboratorio hanno mostrato, così come atteso, l'infiorescenza dal tipico aspetto a cresta di gallo (All. I - scheda n. 27). Le cinque piante di *C. plumosa*, scelte per la presenza di piccole fasciazioni sulle spighe fiorali e accostamento dei fiori, sono state acquistate presso un vivaio di Catania (All. I - scheda n. 26). Un unico esemplare di *C. album*, è stato ritrovato nel settembre del 2010 presso il Foro italico di Palermo; il fusto principale presentava un'evidente fasciazione accompagnata da emissione di foglie clorotiche (All. I - scheda n. 29).

Tra le specie appartenenti alla famiglia Asteraceae sono stati osservati casi teratologici su tre differenti specie: *Carlina gummifera*, *Erigeron bonariensis* e *Picris echioides*.

Diverse piante sintomatiche di *C. gummifera* sono state rinvenute nei mesi di aprile e maggio del 2009 in tre differenti siti: Francavilla di Sicilia (ME), Piedimonte Etneo (CT) e Aidone (EN). In tutti i casi, indipendentemente dal sito di ritrovamento, è stata riscontrata la stessa sindrome: sbiancamento, arricciamento e tomentosità delle foglie, con espansione del rachide fogliare e proliferazione di fasci cribro-vascolari (All. I - schede n. 2, 3, 4).

*Erigeron bonariensis* e *Picris echioides* sono stati rinvenuti nello stesso sito – un vigneto della zona di Caltagirone (CT) – in periodi diversi: rispettivamente luglio 2009 e luglio 2011. Entrambe le piante presentavano evidente accorciamento degli internodi accompagnato da ingiallimento (All. I - schede n. 10, 42).

All'interno della famiglia Boraginaceae sono stati osservati casi teratologici su: *Echium plantagineum* ed *E. vulgare* (All. I - schede n. 19, 24, 28).

Nel marzo 2010, nella riserva naturale di Gorgi Tondi (TP), è stata trovata una pianta di *E. plantagineum* con evidente fasciazione e fillomania. L'infiorescenza, inoltre, non mostrava la tipica struttura racemosa e i fiori si disponevano tutti nella parte sommitale dello scapo (All. I - scheda n. 19).

Due piante di *E. vulgare* sono state rinvenute nei mesi di giugno e luglio del 2010 in due differenti siti della provincia di Catania, una a Monte Serra (Viagrande) e una a Trecastagni. In entrambi i casi, indipendentemente dal sito di ritrovamento, è stata riscontrata la stessa sindrome: fasciazione del fusto e fusti fioriferi raccorciati (All. I - schede n. 24, 28).

Nella famiglia Brassicaceae sono stati osservati casi teratologici su due differenti specie: *Brassica oleracea* subsp. *botrytis* e *B. rapa* (All. I - schede n. 18, 40).

Piante di *B. oleracea* malformate sono stati segnalati nel febbraio del 2010 presso l'azienda agraria Valdisavoia di Catania; la sindrome si manifestava con fasciazione settoriale ed ingiallimento del fusto (All. I - scheda n. 18).

Nel marzo del 2011, presso l'azienda agraria sperimentale dell'Università di Catania, è stato rinvenuto un caso teratologico su *B. rapa* mostrante fasciazione del

fusto, racemo fiorale allungato e proliferazione delle gemme fiorali (All. I - scheda n. 40).

Interessanti casi teratologici sono stati osservati anche su cinque differenti specie appartenenti alla famiglia delle Cactaceae: *Austrocyllindropuntia exaltata* “monstruosa”, *Opuntia cylindrica* “monstruosa”, *O. ficus-indica*, *O. subulata* “monstruosa” e *Pereskia grandifolia*.

Ad eccezione di *Opuntia ficus-indica* e di *P. grandifolia*, rinvenute rispettivamente nell’azienda sperimentale dell’Università di Catania (luglio 2011) e presso l’Orto botanico di Catania (novembre 2009), le altre piante sono state acquistate, nel periodo estivo del 2011, presso un vivaio di Catania.

Su *A. exaltata* “monstruosa” era evidente una proliferazione del fusto e delle gemme (All. I - scheda n. 44); su *O. cylindrica* “monstruosa” evidenti crestature (All. I - schede n. 45), mentre su *O. subulata* “monstruosa” la proliferazione dei cladodi e delle areole (All. I - scheda n. 43). *Opuntia ficus-indica* mostrava, sintomi settoriali quali cladodi modificati, assenza di fiori, frutti e spine (All. I - scheda n. 46).

*Pereskia grandifolia* presentava, oltre ad una riduzione di spine, una fasciazione settoriale su un ramo dell’anno precedente. La sindrome evidenziava un grado di gravità tale che il ramo si curvava avvolgendosi su se stesso ed era oltremodo visibile una necrosi dei tessuti corticali e dei fasci cribro-vascolari. Dal ramo fasciato emergevano getti dell’anno asintomatici (All. I - scheda n. 15).

L’unica specie appartenente alla famiglia delle Convolvulaceae, *Convolvulus arvensis*, è stata ritrovata nel mese di luglio del 2009 presso lo stesso vigneto di Caltagirone, dove sono stati rinvenuti modificazioni morfologiche su *E. bonariensis* e *P. echioides*. Anche in questo caso, la teratologia ha riguardato accorciamento degli internodi e maculature clorotiche delle foglie (All. I - scheda n. 8).

Tra le Euphorbiaceae sono state rinvenute quattro specie interessate da teratologie: *Euphorbia characias*; *E. dendroides*, *E. linifolia* ed *E. myrsinites*.

*E. characias*, rinvenuta nel marzo 2011 nei pressi di Trecastagni (CT), era l’unico caso nel sito che mostrava evidente fasciazione settoriale accompagnata da proliferazione degli abbozzi fiorali. L’asse principale con fasciazione si biforcava in due rami, a loro volta fasciati, che terminavano con una proliferazione di fiori sulla parte sommitale dello scapo (All. I - scheda n. 38).

Il caso teratologico su *E. dendroides* è stato ritrovato nell’Orto botanico di Catania, nel giugno 2009. La sindrome si manifestava con una fasciazione settoriale accompagnata dall’emissione di foglie di piccole dimensioni all’apice del fusto fasciato e necrosi dei tessuti (All. I - scheda n. 7).

Due diverse piante di *E. linifolia* sono state rinvenute presso la Penisola Magnisi di Siracusa, in due diversi periodi del 2009 (marzo e settembre).

Il primo reperto mostrava un’evidente fasciazione settoriale accompagnata da fillomania, ingiallimento e disseccamento; sebbene la fase di prelievo sia avvenuta durante il periodo della fioritura, la parte della pianta fasciata non presentava fiori

(All. I - schede n. 1). Il secondo presentava una fasciazione a carico del fusto, accompagnata dalla produzione di gemme in numero maggiore alla norma (All. I - schede n. 12).

Sulle Madonie, precisamente su Pizzo Carbonara, nel settembre del 2009, è stata riscontrata, una fasciazione settoriale, associata alla proliferazione di foglie modificate nella forma e nella dimensione, su un unico esemplare di *E. myrsinites* (All. I - schede n. 13).

Tra le Fabaceae sono state rinvenute modificazioni di forma su *Genista aetnensis*, *Pararchidendron pruinosum*, *Sophora secundiflora* e *Spartium junceum*.

In due diversi siti del Catanese – Monte Serra (Viagrande) e Nicolosi – e in periodi diversi del 2010 (giugno e settembre), sono state ritrovate popolazioni di *G. aetnensis* con individui interessati da teratologie a carico di alcuni rami.

La pianta di *Genista aetnensis* di Monte Serra, rilevata in fase di fioritura, mostrava fasciazione settoriale unita alla spiralizzazione del ramo su cui si disponevano le gemme fiorali (All. I - scheda n. 23).

Gli esemplari rinvenuti nei pressi di Nicolosi, in fase di fruttificazione, presentavano, invece, fasciazione settoriale con necrosi dei fasci vascolari (All. I - scheda n. 30).

Nel novembre 2009, nell'Orto botanico di Catania, è stata scoperta una fasciazione su *Pararchidendron pruinosum*. La teratologia riguardava la distorsione di un ramo con blastomania nella sua parte apicale e proliferazione di foglie (All. I - scheda n. 17).

Un caso di particolare interesse teratologico è rappresentato da manifestazioni, ormai ripetute, a carico di *Sophora secundiflora*, riscontrate all'interno del giardino Garibaldi di Palermo; il dato viene segnalato già da Ottonello (1986) e l'osservazione effettuata nel 2011 convalida la teratologia riscontrata 25 anni prima; la pianta infatti durante la fioritura mostra ripetute e caratteristiche fasciazioni che interessano l'intero racemo (All. I - scheda n. 39).

Nel caso di *Spartium junceum*, sono stati individuati più siti con popolazioni sintomatiche in diverse aree della Sicilia: Isola di Salina (ME), Monte Serra, Castelbuono (PA) e Palermo.

Nell'agosto del 2010, nell'Isola di Salina era stata osservata una piccola popolazione di *S. junceum* e alcuni esemplari mostravano evidente fasciazione settoriale dei rami con ripiegamento e necrosi (All. I - scheda n. 32).

Nei pressi di Viagrande, nell'area protetta di Monte Serra, sono stati individuati diversi esemplari che sviluppavano forme diverse di teratologie; pertanto, dopo il primo rilevamento, si è ritenuto opportuno effettuare un monitoraggio costante durante tutto il 2010 e 2011, al fine di studiare l'evoluzione sintomatologica. I casi teratologici registrati presentavano scopazzi settoriali che si evolvevano, in alcuni casi, in gravi fasciazioni e crestature; i rami fasciati necrotizzavano totalmente, disseccandosi anticipatamente rispetto al resto della parte vegetativa asintomatica. Le foglie mostravano un aumento della tomentosità e della dimensione, oltre che

fillomania; le terminazioni dei fasci vascolari, spesso, mostravano necrosi; inoltre anche i fiori subivano l'effetto delle malformazioni in quanto, sulle parti interessate, o non si sviluppavano affatto o si sviluppavano solo in numero inferiore di quanto avveniva sui rami asintomatici (All. I - scheda n. 33). L'osservazione nei due anni ha fatto registrare un notevole aumento di piante sintomatiche da un anno all'altro, lasciando ipotizzare la presenza di un vettore animale molto attivo. L'ipotesi è stata confermata dalla cattura, tramite retino entomologico, di una psillide infeudata a *Spartium* [*Livilla spectabilis* (Flor)] con un elevato livello di infestazione.

Nei pressi di Castelbuono, nel marzo 2010, sono state rilevate sindromi che si manifestavano su alcuni esemplari con scopazzi settoriali accompagnati da fasciazioni lineari e crestate, aumento della tomentosità e fillomania. Un successivo sopralluogo ha permesso di accertare un aumento di casi sintomatici accompagnati da una precoce morte delle piante interessate (All. I - scheda n. 34).

Presso l'aeroporto Falcone-Borsellino di Palermo, nel marzo 2010, è stato trovato un piccolo arbusto di *S. junceum* mostrante scopazzi settoriali accompagnati da evidenti fasciazioni (All. I - scheda n. 41).

L'unica specie appartenente alla famiglia delle Oleaceae, *Jasminum sambac*, è stata ritrovata, nel mese di agosto del 2009, presso un giardino privato nel centro storico di Catania. La teratologia ha riguardato fasciazione settoriale dei rami con proliferazione delle gemme fiorali che, tra l'altro, si disponevano parallelamente all'apice del ramo fasciato, creando per concrenscenza un fiore completo (All. I - scheda n. 11).

*Phytolacca dioica*, appartenente alle Phytolaccaceae, è l'unica specie della famiglia interessata da manifestazioni teratologiche, ritrovata nell'Orto botanico di Catania, nel novembre 2009. Si rivela di particolare interesse in quanto, tra i polloni della pianta, solo uno fasciato presenta torsione e ripiegamento, e da esso si sviluppano rametti asintomatici (All. I - scheda n. 16).

Nel giugno del 2009, sempre nello stesso vigneto di Caltagirone, sono stati osservati su diverse piante di *Cynodon dactylon* accorciamento degli internodi e sbiancamento delle foglie (All. I - scheda n. 6).

L'unica specie sintomatica appartenente alla famiglia delle Polygonaceae, individuata in diverse località siciliane, è stata *Rumex bucephalophorus* subsp. *bucephalophorus*. I casi sono stati osservati inizialmente nei pressi di Monte S. Nicolò (Trecastagni) e Monterosso (CT) (All. I - schede n. 35, 36); dopo il primo rilevamento, notata l'alta frequenza del fenomeno, si è ritenuto opportuno portare avanti un monitoraggio costante per tutto il 2010 e il 2011, con lo scopo di studiarne l'evoluzione sintomatologica. Nel marzo del 2011, nei pressi di Poggio Arena - Manfria (CL), è stato trovato un altro sito con piante dello stesso *Rumex* sintomatiche (All. I - scheda n. 37).

In tutti e tre i casi, gli individui si presentavano con internodi raccorciati e proliferazione delle gemme tali da far assumere alla pianta un aspetto "a cuscinetto", mentre i fiori non presentavano stami e pistilli; alcuni individui, sulla stessa pianta

con habitus a cuscinetto, presentavano delle ramificazioni laterali con internodi più allungati e, su queste, molti fiori presentavano sepali ed antere ben formate ma prive di pistillo.

Casi sintomatologici su *Prunus dulcis* – unica specie tra le Rosaceae in cui sono state osservate teratologie – sono stati riscontrati, nel maggio del 2009, presso Delia (CL) (All. I – scheda n. 5). Le piante mostravano fasciazione dei rami dell'anno accompagnate da maculature clorotiche delle foglie, accestimento di tratti di rami e maculature necrotiche sui frutti.

Tra le Scrophulariaceae, sono state rinvenute modificazioni di forma su *Bellardia trixago*, *Linaria heterophylla*, *L. purpurea*, *Scrophularia canina* subsp. *bicolor* e *Verbascum thapsus*.

Nei pressi di Monterosso, nel maggio del 2010, un solo individuo di *B. trixago* presentava un fusto con internodi molto accorciati e proliferazione di foglie; a causa della malformazione, l'infiorescenza non si sviluppava su brattee (All. I - scheda n. 21).

Due piante di *L. heterophylla* sono state rinvenute nei pressi di Monte S. Nicolò, nel maggio 2010; le piante mostravano fasciazione del fusto e dello scapo florale ed i fiori proliferati si disponevano sulla parte sommitale dello scapo florale malformato (All. I - scheda n. 22).

L'unico esemplare di *L. purpurea*, rinvenuto nei pressi di Pedara (CT) nel giugno del 2010, mostrava fasciazione di un fusto sul quale si sviluppavano gli scapi fioriferi accorciati e con fiori apparentemente fertili (All. I - scheda n. 25).

Sulle Madonie, precisamente su Monte Quacella, nel luglio del 2010, sono stati riscontrati diversi esemplari di *Scrophularia canina* subsp. *bicolor* con fasciazione di alcuni scapi fioriferi e con proliferazione delle gemme fiorali (All. I - scheda n. 31).

Nel settembre 2009, nell'Orto botanico di Catania, è stato accertato un caso di fasciazione su *Verbascum thapsus*. La teratologia riguardava la fasciazione dello scapo con fillomania ed alterazione della fillotassi e l'infiorescenza fasciata con asse ripiegato (All. I - scheda n. 14).

Tra le Valerianaceae, nel marzo del 2010, presso Ispica, sono state rinvenute tre piante di *Fedia cornucopiae* (All. I - scheda n. 20). La teratologia ha riguardato evidente accorciamento degli internodi associato a virescenza, leggera fasciazione e sterilità dei fiori.

Tra le Vitaceae, alcune piante di *Vitis vinifera* cv. Chardonnay provenienti da due differenti località, un vigneto di Caltagirone (CT) (All. I - schede n. 9) e uno di Chiaramonte Gulfi (RG) (All. I - schede n. 47), e in periodi diversi (rispettivamente luglio 2009 e luglio 2010), mostravano foglie che si accartocciavano ai margini verso il basso, acquisendo un aspetto angoloso.

Per tutti i casi teratologici riscontrati in pieno campo e nel caso in cui non si trattasse di esemplari unici tenuti in collezione presso Orti botanici o giardini privati, sono stati prelevati campioni vegetali (singoli o multipli) rappresentativi delle piante

mostranti sintomi e anche di piante della stessa specie asintomatiche. Nel caso specifico dello studio, la rappresentatività del campione consisteva nel prelevare tutta la pianta (piante annuali) o parti di pianta con sintomi evidenti ma non mostrante necrosi (piante bienni o perenni). I campioni, catalogati e trasportati a 4°C, sono stati conservati in laboratorio alla stessa temperatura fino all'esecuzione delle analisi molecolari o di isolamento batterico per l'accertamento della presenza di procarioti patogeni.

## 2. IDENTIFICAZIONE DEGLI ISOLATI BATTERICI

### 2.1 Isolamento e morfologia delle colonie

Lo studio sulla presenza di infezioni batteriche da *Rhodococcus fascians*, su piante mostranti sintomi di fasciazioni e scopazzi, è stato effettuato preliminarmente all'accertamento della presenza di fitoplasmi. In base ai saggi effettuati su 14 appartenenti a 12 specie scelte a random tra le 47 individuate, è stato possibile isolare, su substrato generico AND e selettivo D2 Medium, 18 colonie batteriche da sottoporre a successive analisi molecolari e biochimiche per l'accertamento dell'identità. Nella Tabella 5 è riportato il numero complessivo di batteri corrispondenti a colonie isolate da ciascun campione vegetale.

Tab. 5. Origine e ripartizione degli isolati batterici

Taxa	Località di reperimento	N° Isolati
<i>Brassica oleracea</i> L. cv.	Catania	Assente
<i>Brassica rapa</i> L.	Catania	Assente
<i>Chenopodium. album</i> L.	Palermo	2
<i>Echium plantagineum</i> L.	Gorghetti Tondi (TP)	3
<i>Echium vulgare</i> L.	Trecastagni (CT)	1
<i>Echium vulgare</i> L.	Monte Serra, Viagrande (CT)	1
<i>Euphorbia characias</i> L.	Trecastagni (CT)	3
<i>Euphorbia dendroides</i> L.	Catania	3
<i>Genista aetnensis</i> (Raf. Ex Biv.) DC.	Nicolosi (CT)	1
<i>Genista aetnensis</i> (Raf. Ex Biv.) DC.	Monte Serra, Viagrande (CT)	1
<i>Pereskia grandifolia</i> Haw.	Catania	2
<i>Scrophularia canina</i> subsp. <i>bicolor</i> (Sm.) Greuter	Monte Quacella, Madonie (PA)	Assente
<i>Sophora secundiflora</i> (Gomez-Ortega) Lag. ex DC.	Palermo	1
<i>Spartium junceum</i> L.	Monte Serra, Viagrande (CT)	Assente
<b>Totale</b>		<b>18</b>

I caratteri morfologici delle colonie sono stati osservati e registrati così da costituire dei gruppi i cui parametri potessero essere considerati omogenei. I risultati così come mostrato nella Tabella 6.

Tab.6. Caratteri morfologici delle colonie isolate in piante con sintomi di fasciazioni e scopazzi

N° isolati	Forma, elevazione e margine	Consistenza	Colore
7	Colonie irregolari, a margine variamente frastagliato, piatte	Compatta	Bianco
6	Colonie circolari, a margine intero, trasparenti, piatte	Compatta	Variabile dal bianco al paglierino
2	Colonie circolari, a margine intero	Compatta	Rosa arancio
2	Colonie circolari, a margine intero	Mucose	Giallo
1	Colonie circolari a margine intero	Compatta	Arancione

Cinque isolati sono risultati morfologicamente assimilabili a *Rhodococcus fascians*, sulla base del colore e della forma, per questo sono stati sottoposti al test del KOH che permette la distinzione tra gram-positivi e gram-negativi. Tre dei cinque ceppi sono risultati positivi e due negativi.

Tutti gli isolati risultati gram-negativi sono stati esclusi dalle analisi successive dato che al genere *Rhodococcus* appartengono solo batteri gram positivi. Le tre colonie batteriche isolate da *Echium plantagineum*, *Pereskia grandifolia* e *Sophora secundiflora* con morfologia *Rhodococcus* simile e Gram positivi, sono stati scelti e portati in coltura pura su substrato D2 e, successivamente saggiati tramite analisi molecolari e profilo biochimico.

## 2.2 Diagnosi dei batteri tramite PCR con primer universali

I tre isolati, che avevano mostrato colonie con caratteristiche simili a quelle di *R. fascians*, sono stati sottoposti ad analisi PCR con i primer universali 530F/1492R che amplificano la sequenza del gene 16S rRNA, allo scopo di confermarne l'identità. Il prodotto ottenuto dalle tre colonie, un amplicone della taglia attesa di 1000 bp (Fig. 21), è stato eluito da gel e inviato al servizio di sequenziamento per effettuare sequenziamento diretto utilizzando come primer di innescio gli stessi usati in PCR.

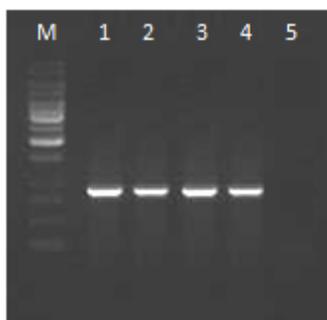


Fig. 21. Elettroforesi su gel d'agarosio 1% mostrante ampliconi della regione 16S rRNA – M, marker 1Kb DNA ladder (Fermentas); 1, colonia batterica isolata da *Echium plantagineum*; 2, colonia batterica isolata da *Pereskia grandifolia*; 3, colonia batterica isolata da *Sophora secundiflora*; 4, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (PVCT156.1.1) controllo positivo; 5, controllo negativo.

### 2.3 Sequenziamento del 16S rRNA batterico

Le sequenze, ottenute come cromatogrammi, sono state convertite nel formato FASTA e sottoposte ad analisi con il programma BLAST per la ricerca rapida di similarità con altre sequenze già depositate nella banca dati GeneBank.

I risultati ottenuti sono:

✓ il batterio isolato da *Echium plantagineum* (899 bp) ha mostrato una similarità di sequenza del 99% con *Rhodococcus kroppenstedtii* (GenBank EU977670.1)

✓ il batterio isolato da *Pereskia grandifolia* (924 bp) ha mostrato una similarità di sequenza del 99% con *Enterococcus gallinarum* (GenBank JN412816.1)

✓ il batterio isolato da *Sophora secundiflora*. (895bp) ha mostrato una similarità di sequenza del 99% con un batterio ambientale non identificato (GenBank FN421640.1).

Dato che tutti e tre i batteri sono risultati batteri ambientali o normali epifiti non patogeni di specie vegetali, è stato possibile escludere la presenza di *R. fascians* in tutti i 14 campioni analizzati.

### 2.4 Primer specie-specifici per l'identificazione di *Rhodococcus fascians*

I dati ottenuti tramite sequenziamento del 16S rRNA sono stati confermati tramite l'analisi PCR con i primer specie-specifici per *R. fascians*, JRRIGHT e JRELEFT, che ha dato risultato positivo solo con il ceppo di riferimento di *R. fascians* (CFBP 2401), utilizzato come controllo positivo (banda della dimensione attesa di 225 bp), e negativo in tutti gli altri campioni vegetali saggiati.

### 2.5 Profilo metabolico e identificazione automatizzata

L'isolato di *Rhodococcus* spp., ottenuto dalla pianta di *Echium plantagineum*, è stato ulteriormente caratterizzato mediante sistema automatizzato Biolog. L'isolato, sebbene presentasse un profilo metabolico simile a quello di *R. fascians*, non è stato identificato in maniera certa in quanto il valore di similarità ottenuto è stato minore di 0,5 ed è tipico di batteri di altre specie ma appartenenti allo stesso genere, a conferma di quanto riscontrato tramite PCR e sequenziamento del 16S rRNA che ne aveva definito la similarità a *Rhodococcus kroppenstedtii*.

### 3. CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI FITOPLASMI

#### 3.1 Estrazione degli acidi nucleici totali

Nonostante le difficoltà caratterizzanti il rilevamento del DNA fitoplasmale in matrici vegetali differenti (piante erbacee, legnose e succulente), per la bassa concentrazione e la presenza di inibitori, sia il protocollo Proteinasi K per l'estrazione degli acidi nucleici totali per le specie appartenenti al gruppo delle Cactaceae che il protocollo CTAB per tutte le altre specie vegetali analizzate si sono dimostrati sufficientemente idonei agli scopi per cui erano stati scelti, come confermato dalle analisi PCR successivamente effettuate sugli acidi nucleici totali così estratti. I metodi vengono considerati "sufficientemente" idonei per il numero di campioni risultati negativi alle successive analisi PCR per l'accertamento della presenza di fitoplasmi (vedi dopo) che lascia ipotizzare, anche se preliminarmente, una scarsa efficienza dei metodi di estrazione nell'eliminazione di molecole inibitrici la reazione di PCR presenti nelle diverse matrici vegetali (es.: lattice di *Euphorbia* spp.).

#### 3.2 Diagnosi dei fitoplasmi tramite nested-PCR con primer universali

Dei 47 campioni vegetali catalogati con sintomi ascrivibili a fitoplasmi, solo per 5 di essi non è stato possibile effettuare l'estrazione degli acidi nucleici totali ed analisi molecolari, a causa della scarsa idoneità del materiale vegetale: tre di essi (*Pararchidendron pruinosum*, *Pereskia grandifolia*, *Phytolacca dioica*) oltre ad essere in collezione come esemplari unici presso l'Orto botanico di Catania presentavano organi sintomatici lignificati ed in necrosi; *Verbascum thapsus* e *Jasminum sambac* oltre ad essere stati segnalati tardivamente (pianta od organi sintomatici già in fase di senescenza) erano mantenuti in collezione come esemplari unici.

Il DNA totale estratto dai restanti 42 campioni è stato sottoposto a PCR diretta con P1/P7 e P1/16S-SR (in grado di amplificare gli operoni 16S, la zona IS e il 23S) seguita da nested-PCR con la coppia di primer R16F2n/R2 (solo 16S rRNA).

La visualizzazione del prodotto di PCR diretta non è stata compiuta in quanto, ai fini della classificazione dei fitoplasmi rilevati, era necessario ottenere un amplicone del 16S rRNA ad alta concentrazione. Solo raramente, infatti, è possibile ottenere prodotti di amplificazione da PCR diretta a concentrazioni rilevabili in campioni provenienti da campo. Per tale motivo, nella diagnosi dei fitoplasmi è sempre necessario eseguire la nested-PCR.

Dei 42 campioni sottoposti a nested-PCR con i primer R16F2n/R2, 19 sono risultati positivi, ed hanno prodotto un amplicone della taglia attesa di circa 1239 nucleotidi circa (Fig. 22A, Tab. 7).

I frammenti di DNA (~1,2 Kb), amplificati con la nested-PCR, corrispondono alla regione del gene 16Sr RNA, in accordo con il DNA del controllo positivo.

I saggi di nested-PCR effettuati con la coppia di primer fU5/rU3, effettuati allo scopo di confermare i dati ottenuti precedentemente e di tentare di aumentare la sensibilità diagnostica, hanno prodotto ampliconi della taglia attesa di 876 nucleotidi in 23 dei 42 campioni analizzati (Fig. 22B, tab. 7). In questo modo, ai 18 campioni risultati positivi in nested-PCR con R16F2n/R2, è stato possibile aggiungere altri quattro campioni affetti da fitoplasmi; i campioni in esame appartengono tutti alla famiglia delle Euphorbiaceae (*Euphorbia characias*, *E. dendroides*, *E. linifolia* ed *E. myrsinites*). Si conferma così che il livello di pulizia degli acidi nucleici totali estratti da alcune matrici vegetali non era elevato a causa della presenza di sostanze, come il lattice, inibenti la reazione di amplificazione con R16F2n/R2.

Tutti i campioni asintomatici raccolti ed analizzati quali controlli negativi, non hanno prodotto ampliconi con entrambe le coppie di prime utilizzati.

Per i casi teratologici di *S. junceum* sono state analizzate parti diverse della stessa pianta allo scopo di valutare la distribuzione dei fitoplasmi negli organi sintomatici e non. Il DNA fitoplasmale è stato rilevato su porzioni diverse della stessa pianta (rami clorotici, fiori apparentemente sani, fasciazioni lineari e scopazzi) ma è da rilevare come organi con sintomi molto intensi quali crestature sono risultati negativi.

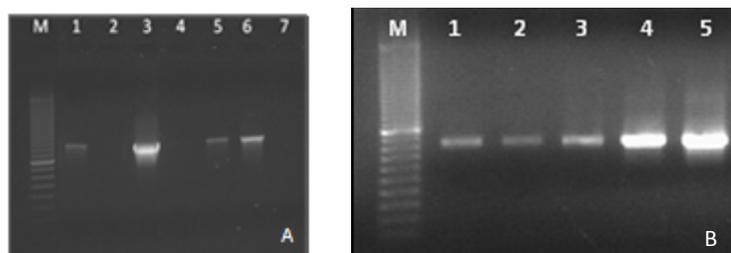


Fig. 22. Elettroforesi su gel d'agarosio 1% mostrante alcuni prodotti di amplificazione ottenuti in nested-PCR. A) (R16F2n/R2): 1, *Spartium junceum* sintomatico; 2, *S. junceum* sano; 3, *Rumex bucephalophorus* sint., 4, *R. bucephalophorus* sano.; 5, *Linaria heterophylla*, 6, *Fedia cornucopiae*; 7, *R. bucephalophorus* sano. B) (fU5/rU3): 1, *Euphorbia linifolia*; 2, *E. dendroides*; 3, *E. myrsinites*; 4, *E. characias*; 5, *Cynodon dactylon*. - M, marker 100 bp EZ load (Promega).

### 3.3 Primer gruppo specifici per il riconoscimento di fitoplasmi noti

Registrata la posizione delle piante erbacee *Erigeron bonariensis*, *Convolvulus arvensis* e della cultivar Chardonnay di *Vitis vinifera* sintomatiche nello stesso vigneto nei pressi di Caltagirone (CT) dove era stata precedentemente segnalata la presenza del fitoplasma responsabile del Legno Nero (LN, appartenente al gruppo

dei Giallumi della vite) si è proceduto all'accertamento diretto della specie di fitoplasmi tramite la coppia di primer gruppo-specifici R16(I)F1/R1 (specifici per il gruppo LN). Tutti e tre i campioni sono risultati positivi ed hanno mostrato un amplicone della corrispondente taglia di circa 800 bp (Fig. 23A). E' stata così confermata l'associazione della sindrome del LN alla vite e sono stati individuati 2 ospiti diversi dello stesso fitoplasma. La sindrome sugli stessi era totalmente diversa da quella causata su vite. Campioni asintomatici delle tre specie raccolti nello stesso sito non hanno dato produzione di ampliconi, come già evidenziato nella nested PCR con primer R16F2n/R2.

Anche nel caso di *Cynodon dactylon* e sulla base dell'osservazione dei sintomi (sbiancamento della foglia, accostimento della pianta) è stato deciso di discriminare la specie di fitoplasmi presenti tramite l'utilizzo dei primer BGWL4f/r specifici per il fitoplasma Bermuda grass white leaf (BGWL). La produzione di ampliconi di taglia attesa di 300 bp ottenuti (Fig. 23B) ha confermato, così come atteso, la presenza del fitoplasma BGWL nel campione di *Cynodon dactylon*. Campioni asintomatici della stessa specie raccolti nello stesso sito non hanno dato produzione di ampliconi, come già evidenziato nella nested-PCR con primer R16F2n/R2.

Allo scopo di individuare l'identità della specie di fitoplasma riscontrata con primer fU5/rU3 in *Euphorbia characias*, *E. dendroides*, *E. linifolia* ed *E. myrsinites* (amplicone di taglia non sufficiente a permettere di identificare la specie o il gruppo di fitoplasma), si è proceduto alla amplificazione con nested-PCR utilizzando i primer-gruppo specifici citati sopra. Nonostante l'assenza di sintomi riferibili al BGWL nelle specie in studio esse sono risultate positive con i primer BGWL4f/r (ampliconi di 300 bp) indicando la presenza del fitoplasma BGWL. Anche in questo caso l'assenza di fitoplasmi è stata confermata in campioni asintomatici della stessa specie e prelevati negli stessi siti.

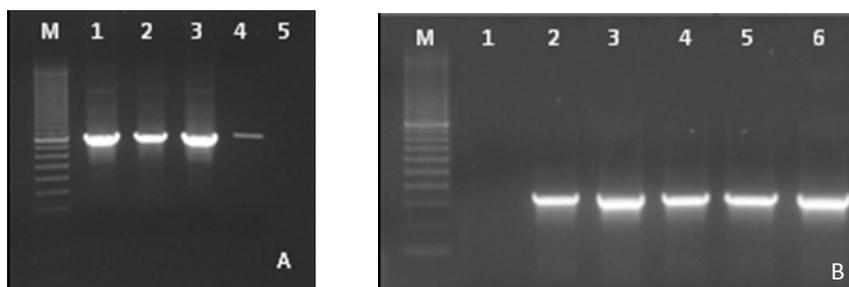


Fig. 23. Elettroforesi su gel d'agarosio 1% mostrante alcuni prodotti di amplificazione ottenuti in PCR diretta. A) (R16(I) F1/R1): 1, *Erigeron bonariensis*; 2, *Convolvulus arvensis*; 3, *Vitis vinifera*; 4, controllo LN; 5, *Rumex bucephalophorus*; B) (BGWL4f/r): 1, *Cynodon dactylon* asintomatico; 2, *Euphorbia characias*; 3, *E. dendroides*; 4, *E. linifolia*; 5, *E. myrsinites*; 6, *Cynodon dactylon* sintomatico; - M, marker 100 bp EZ load (Promega).

Tabella 7. Risultati ottenuti mediante nested-PCR con i primer usati per amplificare l'operone 16S rRNA del fitoplasma

Taxon	Località	Data prelievo	Primer universali	
			R16F2n/R2	fU5/rU3
<i>Celosia crestatata</i>	Catania	06/10	-	-
<i>Celosia plumosa</i>	Catania	06/10	-	-
<i>Chenopodium album</i>	Palermo	09/10	-	-
<i>Carlina gummifera</i>	Francavilla di Sicilia (ME)	04/09	-	-
	Piedimonte etneo (CT)	05/09	-	-
	Aidone (EN)	05/09	-	-
<i>Erigeron bonariensis</i>	Caltagirone (CT)	07/09	+	+
<i>Picris echioides</i>	Catania	07/11	+	+
<i>Echium plantagineum</i>	Mazara del Vallo (PA)	03/10	-	-
<i>Echium vulgare</i>	Trecastagni (CT)	07/10	-	-
	Viagrande (CT)	06/10	-	-
<i>Brassica oleracea</i>	Catania	02/10	+	+
<i>Brassica rapa</i>	Catania	03/11	-	-
<i>Austrocylindropuntia exaltata</i>	Catania	07/11	+	+
<i>Opuntia cylindrica</i>	Catania	07/11	-	-
<i>Opuntia ficus-indica</i>	Catania	07/11	+	+
<i>Opuntia subulata</i>	Catania	07/11	+	+
<i>Convolvulus arvensis</i>	Caltagirone (CT)	07/09	+	+
<i>Euphorbia characias</i>	Trecastagni (CT)	03/11	-	+
<i>Euphorbia dendroides</i>	Catania	06/09	-	+
		03/09	-	+
<i>Euphorbia linifolia</i>	Priolo Gargallo (SR)	09/09	-	-
		09/09	-	+
<i>Euphorbia myrsinites</i>	Madonie (PA)	09/09	-	+
<i>Genista aetnensis</i>	Viagrande (CT)	06/10	-	-
	Nicolosi (CT)	09/10	-	-
<i>Sophora secundiflora</i>	Palermo	03/10	-	-
<i>Spartium junceum</i>	Palermo	03/10	-	-
	Castelbuono (PA)	03/10	+	+
	Viagrande (CT)	'10 - '11	+	+
	Salina (ME)	08/10	+	+
<i>Cynodon dactylon</i>	Caltagirone (CT)	06/09	+	+
<i>Rumex bucephalophorus</i>	Trecastagni (CT)	'10 - '11	+	+
	Monterosso (CT) - MR1	'10 - '11	+	+
	Monterosso (CT) - MR2	'10 - '11	+	+
	Manfria (CL)	03/11	+	+
<i>Prunus dulcis</i>	Delia (CL)	05/09	-	-
<i>Bellardia trixago</i>	Monterosso (CT)	05/10	-	-
<i>Linaria heterophylla</i>	Trecastagni (CT)	05/10	+	+
<i>Linaria purpurea</i>	Pedara (CT)	06/10	-	-
<i>Scrophularia canina</i>	Madonie (PA)	07/10	-	-
<i>Fedia cornucopiae</i>	Ispica (RG)	03/10	+	+
<i>Vitis vinifera</i>	Caltagirone (CT)	07/09	+	+
	Chiaromonte Gulfi (RG)	07/11	+	+

### 3.4 Purificazione del DNA dopo reazioni di PCR

Tutti i 18 campioni risultati positivi in nested-PCR con i primer R16F2n/R2 e fU5/rU3 e per i quali non è stato possibile identificarne l'identità dei fitoplasmi tramite primer gruppo-specifici, sono stati successivamente sottoposti ad analisi miranti al sequenziamento per la definizione della specie e del gruppo/sottogruppo del fitoplasma.

Una volta visualizzate le bande corrispondenti agli ampliconi di taglia attesa su gel di agarosio all'1% (nested-PCR con i primer universali R16F2n/R2 ed fU5/rU3), si è proceduto al taglio della banda ed all'eluizione da gel dell'amplicone tramite GFX™ PCR and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare). In tale modo è stato possibile eliminare bande aspecifiche di amplificazione ed i reagenti utilizzati nella reazione di PCR che avrebbero successivamente disturbato la reazione di sequenziamento.

Il DNA ottenuto da PCR e da successiva eluizione il DNA eluito di ogni singolo campione (5µl), è stato quantificato, in gel di agarosio 1% a confronto con il marker di quantificazione, allo scopo di calcolare la quantità esatta da utilizzare nella reazione di ligazione e sequenziamento. I campioni in studio non hanno mostrato la stessa concentrazione (Fig. 24) ed è, quindi, stato necessario calcolare la quantità da sottoporre al successivo clonaggio ( $\geq 15$  ng) o sequenziamento diretto (8-16 ng) per singolo campione (*E. linifolia* ed *E. dendroides*).

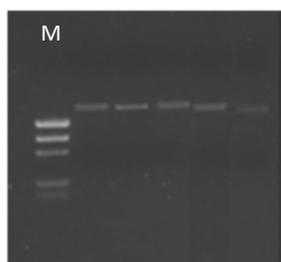


Fig. 24. Purificazione delle bande di DNA fitoplasmale; M, marker di mobilità elettroforetica Precision Molecular Mass Ruler (Bio-Rad)

### 3.5 Reazione di ligazione in vettore plasmidico e clonaggio

Circa 20 ng di prodotto PCR ottenuto tramite eluizione dai 16 campioni risultati positivi in nested-PCR F2/R2 è stato sottoposto a clonaggio. L'efficienza della trasformazione per singolo amplicone è stata valutata sulla base della percentuale delle colonie bianche, non esprimibili il gene della  $\beta$ -galattosidasi (*lacZ*) e quindi trasformate, rispetto a quelle blu, non trasformate. Per tutte le reazioni di clonaggio

le colonie bianche sono risultate in numero nettamente maggiore rispetto a quelle blu dimostrando un'alta efficienza delle reazioni di clonaggio.

### 3.6 Isolamento del DNA plasmidico

L'efficienza di ligazione è stata valutata tramite analisi di restrizione con EcoRI dei plasmidi estratti da singoli cloni ottenuti dalle 16 reazioni di clonaggio (FastPlasmid<sup>TM</sup>, 5Prime) in gel di agarosio all'1%. Tutti i cloni contenevano l'inserto della taglia attesa (Fig. 25A). La concentrazione del DNA plasmidico estratto è stato quantificato in gel di agarosio all'1% a confronto con marker quantificatore (Fig. 25B) e per ogni campione sono stati essiccati 200-250 ng di DNA da sottoporre a sequenziamento.

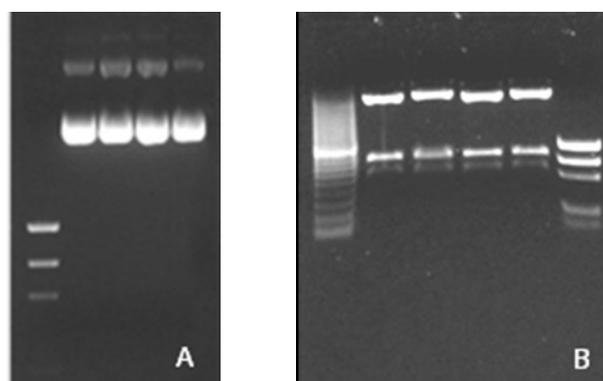


Fig. 25. Elettroforesi su gel d'agarosio 1,5%. A) Alcuni cloni di DNA fitoplasmale ottenuti dall'estrazione plasmidica; B) Digestione con enzimi di restrizione EcoRI

### 3.7 Sequenziamento del 16S rRNA fitoplasmale

Tutte le reazioni di sequenziamento hanno prodotto risultati positivi corrispondenti a fentogrammi leggibili e traducibili in sequenze sia tramite lettura automatica che manuale. Dal clonaggio dei prodotti, amplificati con i primer R16F2n/R2, sono state ottenute sequenze parziali forward e revers da tutti i sedici ampliconi clonati. Come atteso le sequenze ripulite e ricostruite manualmente, hanno mostrato una lunghezza compresa tra 1239 e 1247 bp.

Le due sequenze ottenute direttamente dai prodotti PCR, amplificati con i primer fU5/rU3, hanno mostrato sia per *Euphorbia linifolia* che per *E. dendroides*, una lunghezza di 813 bp.

### 3.8 Analisi bioinformatica dei dati di sequenza

Allo scopo di identificare i fitoplasmi associati alle piante sintomatiche tramite nested-PCR, le sedici sequenze dei frammenti 16S rRNA ottenute sono state confrontate, mediante il programma BLAST, con tutte quelle già depositate in GeneBank. In base alla similarità di sequenza con i ceppi di riferimento ('reference strain') delle differenti specie di '*Ca. Phytoplasma*' note, è stato possibile correlare i diversi fitoplasmi in studio (come 'related strain') alla specie '*Ca. Phytoplasma*' più simile ( $\geq 75\%$  di similarità). Una volta evidenziato il '*Ca. Phytoplasma*' più vicino ad ogni singolo campione, sono stati effettuati allineamenti globali tra i due (query e reference), mediante il software *Needle* - EMBL-EBI, allo scopo di evidenziare i cambi (mutazioni, delezioni ed inserzioni) tra la sequenza di ciascun fitoplasma ed ceppo di riferimento della specie '*Ca. Phytoplasma*' correlata (All. II).

I risultati riguardanti la similarità di sequenza e le variazioni puntiformi, rispetto al reference strain, possono essere così schematizzati e sono visualizzati negli allineamenti in Allegato II:

✓ il fitoplasma isolato da *Brassica oleracea* (1244 bp) è correlato, con similarità di sequenza del 99,7%, alla specie "*Ca. Phytoplasma asteris*" (reference strain M30790) dalla quale si differenzia per tre cambi, tre delezioni ed un'inserzione;

✓ il fitoplasma isolato da *Vitis vinifera* (1241 bp) è correlato, con similarità di sequenza del 99,4%, alla specie "*Ca. Phytoplasma solani*" (reference strain AF248959) dalla quale si differenzia per otto cambi;

✓ il fitoplasma isolato da *Fedia cornucopiae* (1243 bp) è correlato, con similarità di sequenza del 99,6%, alla specie "*Ca. Phytoplasma asteris*" (reference strain M30790) dalla quale si differenzia per cinque cambi ed una delezione;

✓ il fitoplasma isolato da *Linaria heterophylla* (1243 bp) è correlato, con similarità di sequenza del 99,6%, alla specie "*Ca. Phytoplasma asteris*" (reference strain M30790) dalla quale si differenzia per cinque cambi e tre delezioni;

✓ i fitoplasmi isolati da *Opuntia subulata*, *Austrocyllindropuntia exaltata* e *Opuntia ficus-indica* (1244 bp) sono correlati, con similarità di sequenza, rispettivamente, del 98,7%, 98,9% e 99%, alla specie "*Ca. Phytoplasma aurantifolia*" (reference strain U15442) dalla quale si differenziano: *Opuntia subulata* per quindici cambi, due delezioni e due inserzioni; *Austrocyllindropuntia exaltata* per quattordici cambi, due delezioni e due inserzioni; *Opuntia ficus-indica* per dodici cambi, due delezioni e due inserzioni;

✓ il fitoplasma isolato da *Picris echioides* (1247 bp) è correlato, con similarità di sequenza del 98,9%, alla specie "*Ca. Phytoplasma phoenicium*" (reference strain AF515636) dalla quale si differenzia per quattordici cambi;

✓ i fitoplasmi isolati dalle cinque piante di *Rumex bucephalophorus* (isolati MR1, Monte Rosso 1; SN1, San Nicolò 1; MR2, Monte Rosso 2; MA, Manfria;

SN2, San Nicolò 2) (1243 bp), sono correlati, con le seguenti similarità di sequenza alla specie “*Ca. Phytoplasma asteris*” (reference strain M30790): MR1, MA e SN2, 99,8%; SN1, 99,7%; MR2, 99,4%). Da essa si differenziano: *R. bucephalophorus* MR1 per tre cambi e due delezioni; *R. bucephalophorus* SN1 per quattro cambi e tre delezioni; *R. bucephalophorus* MR2 per sette cambi e tre delezioni; *R. bucephalophorus* MA per tre cambi e due delezioni; *R. bucephalophorus* SN2 per tre cambi e due delezioni;

✓ i fitoplasmi isolati dalle due piante di *Spartium junceum* (isolati SA, CB) (1239, 1240 bp) sono correlati, con similarità di sequenza, rispettivamente, del 99,8%, 99,9%, alla specie “*Ca. Phytoplasma spartii*” (reference strain X92869) dalla quale si differenziano: *S. junceum* SA per tre cambi; *S. junceum* CB per un cambio;

✓ il fitoplasma isolato da *Spartium junceum* (isolato Monte Serra) (1245 bp), è correlato, con similarità di sequenza del 99,5%, alla specie “*Ca. Phytoplasma vitis*” (reference strain AF176318) dalla quale si differenzia per sei cambi.

Allo scopo di evidenziare eventuale variabilità di popolazione, nel caso dei fitoplasmi isolati da piante appartenenti alla stessa famiglia, è stato necessario effettuare allineamenti multipli, mediante l’utilizzo del programma CLUSTALW, tra le sequenze dei diversi isolati e le sequenze del ‘*Ca. Phytoplasma*’ di riferimento (All. II).

Nell’ambito della famiglia delle Cactaceae, nonostante gli isolati provenissero da specie diverse (*Opuntia subulata*, *Austrocylindropuntia exaltata* e *Opuntia ficus-indica*), le sequenze sono risultate molto simili tra loro e formanti un cluster distinto rispetto dal ‘*Ca. Phytoplasma aurantifolia*’, come evidenziato dai cambi derivati dagli allineamenti multipli (All. II) e dal relativo dendrogramma (Fig. 26). Si può dedurre l’elevata stabilità di tali isolati di fitoplasma nonostante il passaggio su specie differenti.



Fig. 26. Dendrogramma ottenuto con ClustalW per gli isolati ottenuti da Cactaceae

Le sequenze degli isolati ottenuti dalla specie *R. bucephalophorus* hanno mostrato un numero esiguo di cambi e un’elevata percentuale di similarità (>99%) con ‘*Ca. Phytoplasma asteris*’, come si evince dagli allineamenti multipli (All. II) e dal relativo dendrogramma (Fig. 27). L’isolato MR2 è l’unico che, presentando cinque cambi rispetto agli altri, si colloca in un cluster distinto dagli altri ma pur

sempre vicino al ‘reference strain’. Tali risultati dimostrano l’elevata stabilità di tali isolati di *R. bucephalophorus*, pur provenendo da località e altitudini differenti (circa 20m s.l.m. l’isolato MA e circa 500m s.l.m. gli isolati MR1, MR2, SN1 e SN2).



Fig. 27. Dendrogramma ottenuto con ClustalW per gli isolati ottenuti da *Rumex bucephalophorus*

Una situazione differente si verifica nell’ambito della specie *Spartium junceum*.

Nonostante gli isolati SA e CB siano correlati alla stessa specie ‘*Ca. Phytoplasma spartii*’, l’isolato MS è risultato correlato al ‘*Ca. Phytoplasma vitis*’. E’ interessante notare come nell’allineamento multiplo con entrambi i ceppi di riferimento, l’isolato SA si colloca in un cluster distinto e in posizione intermedia (All. II, Fig. 28) tra i due ‘reference strain’ ‘*Ca. Phytoplasma spartii*’ e ‘*Ca. Phytoplasma vitis*’. In questo caso si sottolinea come isolati dello stesso fitoplasma estratti dalla stessa specie vegetale e possibilmente trasmessi da un unico vettore sono sottoposti ad una pressione selettiva da parte dell’ospite.



Fig. 28. Dendrogramma ottenuto con ClustalW per gli isolati ottenuti da *Spartium junceum*

Per quanto riguarda le sequenze parziali del 16S rRNA (primer fU5/r/U3) ottenute da *Euphorbia myrsinites* ed *E. dendroides*, entrambi di 813 bp, la ricerca per similarità in BLAST ha individuato per entrambi l’elevata similarità (99%) con il ‘*Candidatus Phytoplasma cynodontis*’ dal quale, in base ai risultati

dell'allineamento multiplo tramite CLUSTALW, differiscono per due soli cambi (All. II). Nonostante non si possa assegnare il valore di 'related strain' a queste due sequenze, vista l'assenza del prodotto PCR totale del 16S rRNA, è confermata l'identità del fitoplasma così come precedentemente riscontrato in PCR con primer specifici BGWL4f/r.

Una volta stabilita l'identità dei fitoplasmi oggetto di questo studio e riscontrata la diversità della sequenza parziale o totale del gene 16S rRNA (discriminante di specie) da quelle già depositate in GenBank, tutte le sequenze del gene, denominate in base al nome della pianta ospite seguito dal sintomo principale e dal nome dell'isolato, sono state depositate in GenBank (Tab. 8), al fine di rendere disponibili alla comunità scientifica le nuove sequenze.

Tab.8. Risultati del sequenziamento e numeri di accessione delle sequenze depositate in GenBank

Query	bp	GenBank acc. N.
Brassica olearacea fasciation phytoplasma isolate CT	1244	JQ181539
Bois noir phytoplasma isolate CG	1241	JQ181540
Fedia virescence phytoplasma isolate IS	1243	JQ181541
Linaria fasciation phytoplasma isolate TR	1243	JQ181542
Opuntia subulata phytoplasma isolate CT	1244	JQ181543
Austrocylindropuntia phytoplasma isolate CT	1244	JQ181544
Opuntia ficus-indica phytoplasma isolate CT	1244	JQ181545
Picris yellows phytoplasma isolate Cal	1247	JQ181546
Rumex dwarf phytoplasma isolate MR1	1243	JQ181547
Rumex dwarf phytoplasma isolate SN1	1243	JQ181548
Rumex dwarf phytoplasma isolate MR2	1243	JQ181549
Rumex dwarf phytoplasma isolate MA	1243	JQ181550
Rumex dwarf phytoplasma isolate SN2	1243	JQ181551
Spartium witches' broom phytoplasma isolate SA	1239	JQ181552
Spartium witches' broom phytoplasma isolate CB	1240	JQ181553
Spartium witches' broom phytoplasma isolate MS	1245	JQ181554
Euphorbia dendroides fasciation phytoplasma isolate CT	813	JQ181555
Euphorbia linifolia fasciation phytoplasma isolate PG	813	JQ181556

### 3.9 RFLP VIRTUALI

Tutte le sedici sequenze 16S rRNA F2nR2 ottenute, sono state analizzate tramite RFLP virtuali (<http://plantpathology.ba.ars.usda.gov/cgi-bin/resource/iphyclassifier.cgi>), allo scopo di assegnare gruppo e sottogruppo di classificazione di appartenenza. Una volta inserita la sequenza query in formato FASTA nella pagina web, tra le opzioni possibili, è stata richiesta l'acquisizione di gruppo e sottogruppo, la definizione dei dettagli dei profili RFLP (pattern\_comparison\_detail), dove sono annotati i risultati di  $N_x$ ,  $N_y$ ,  $N_{xy}$  per singolo enzima e la visualizzazione del gel virtuale.

I risultati dell'assegnazione del gruppo e sottogruppo, dell'analisi dei

pattern\_comparison\_detail e del gel virtuale con i 17 enzimi di restrizione, per le sequenze analizzate sono schematizzate di seguito:

- ✓ *Brassica olearacea* fasciation phytoplasma isolate CT (Acc. N. JQ181539), è risultato identico, con un coefficiente di similarità 1, al profilo del ceppo tipo (type sequence) del gruppo 16SrI, sottogruppo B (NC005303: Onion yellows phytoplasma OY-M) (Tab. 9; Fig. 29). In base a tale risultato si può affermare che il fitoplasma appartiene al gruppo 16SrI-B.
- ✓ Bois noir phytoplasma isolate CG (Acc. N. JQ181540), è risultato diverso dai gruppi/sottogruppi finora descritti. Il più simile, con un coefficiente di similarità 0,97, è il profilo del ceppo tipo del gruppo 16SrXII, sottogruppo A (AJ964960: 'Ca. Phytoplasma solani' isolato 2642BN). In base alla digestione con l'enzima discriminante Bfa, il fitoplasma potrebbe appartenere ad un nuovo sottogruppo all'interno del gruppo 16SrXII ma l'accertamento definitivo può avvenire solo tramite RFLP reali del prodotto PCR (Tab. 9; Fig. 29).
- ✓ *Fedia virescens* phytoplasma isolate IS (Acc. N. JQ181541), è risultato diverso dai gruppi/sottogruppi finora descritti. Il più simile, con un coefficiente di similarità 0,97, è il profilo del ceppo tipo del gruppo 16SrI, sottogruppo B (NC005303: Onion yellows phytoplasma OY-M). Il profilo ottenuto con l'enzima discriminante HpaII consente di affermare che il fitoplasma potrebbe appartenere ad un nuovo sottogruppo all'interno del gruppo 16SrI ma l'accertamento definitivo può avvenire solo tramite RFLP reali del prodotto PCR (Tab. 9; Fig. 29).
- ✓ *Linaria fasciation* phytoplasma isolate TR (Acc. N. JQ181542), è risultato identico, con un coefficiente di similarità 1, al profilo del ceppo tipo del gruppo 16SrI, sottogruppo B (NC005303: Onion yellows phytoplasma OY-M) (Tab. 9; Fig. 29). Pertanto, si può affermare che il fitoplasma appartiene al gruppo 16SrI-B.
- ✓ *Opuntia subulata* phytoplasma isolate CT (Acc. N. JQ181543), è risultato diverso da tutti i gruppi/sottogruppi precedentemente descritti. Il più simile, con un coefficiente di similarità 0,95 ( $\leq 0,97$ ), è il profilo del ceppo di riferimento del gruppo 16SrII, sottogruppo C (AJ293216: Cactus witches'-broom phytoplasma YNO1), come si evince dal profilo RFLP ottenuto per digestione con gli enzimi discriminanti HinfI e Sau3AI. Il fitoplasma, in questo caso, potrebbe rappresentare un nuovo sottogruppo all'interno del gruppo 16SrII ma l'accertamento definitivo può avvenire solo tramite RFLP reali del prodotto PCR (Tab. 9; Fig. 30).
- ✓ *Austrocylindropuntia* phytoplasma isolate CT (Acc. N. JQ181544), è risultato diverso da tutti i gruppi/sottogruppi finora descritti. Il più simile, con un coefficiente di similarità 0,97, è il profilo del ceppo tipo del gruppo 16SrII, sottogruppo C (AJ293216: Cactus witches'-broom phytoplasma YNO1). Come si desume dal profilo RFLP ottenuto per digestione con l'enzima discriminante TaqI, anche questo fitoplasma potrebbe rappresentare un nuovo sottogruppo

all'interno del gruppo 16SrII ma l'accertamento definitivo può avvenire solo tramite RFLP reali del prodotto PCR (Tab. 9; Fig. 30).

- ✓ *Opuntia ficus-indica* phytoplasma isolate CT (Acc. N. JQ181545), è risultato più simile, con un coefficiente di similarità 0.98, al profilo del ceppo tipo del gruppo 16SrII, sottogruppo I (EU099551: Cactus witches'-broom phytoplasma strain YNN06). Il profilo RFLP ottenuto per digestione con l'enzima discriminante *HinfI*, permette di affermare che il fitoplasma è una variante del gruppo 16SrII-I (Tab. 9; Fig. 30).
- ✓ *Picris yellows* phytoplasma isolate Cal (Acc. N. JQ181546), è risultato identico, con un coefficiente di similarità 1, al profilo del ceppo tipo del gruppo 16SrIX, sottogruppo C (Y16389: *Picris echioides* yellows phytoplasma) (Tab. 9; Fig. 30). Il fitoplasma oggetto di studio appartiene, quindi, al gruppo 16SrIX-C.
- ✓ *Rumex dwarf* phytoplasma isolate MR1 (Acc. N. JQ181547), è risultato identico, con un coefficiente di similarità 1, al profilo del ceppo tipo del gruppo 16SrI, sottogruppo B (NC005303: Onion yellows phytoplasma OY-M) (Tab. 9; Fig. 31). Il fitoplasma appartiene al gruppo 16SrI-B.
- ✓ *Rumex dwarf* phytoplasma isolate SN1 (Acc. N. JQ181548), è risultato identico, con un coefficiente di similarità 1, al profilo del ceppo tipo del gruppo 16SrI, sottogruppo B (NC005303: Onion yellows phytoplasma OY-M) (Tab. 9; Fig. 31). Anche in questo caso, il fitoplasma oggetto di studio appartiene al gruppo 16SrI-B.
- ✓ *Rumex dwarf* phytoplasma isolate MR2 (Acc. N. JQ181549), è risultato identico, con un coefficiente di similarità 1, al profilo del type di riferimento del gruppo 16SrI, sottogruppo B (NC005303: Onion yellows phytoplasma OY-M) (Tab. 9; Fig. 31). Anche questo fitoplasma appartiene al gruppo 16SrI-B.
- ✓ *Rumex dwarf* phytoplasma isolate MA (Acc. N. JQ181550), è risultato più simile, con un coefficiente di similarità 0.97, al profilo del ceppo tipo del gruppo 16SrI, sottogruppo B (NC005303: Onion yellows phytoplasma OY-M). Dal profilo RFLP ottenuto per digestione con l'enzima discriminante *AluI*, si desume che il fitoplasma potrebbe rappresentare un nuovo sottogruppo del gruppo I ma l'accertamento definitivo può avvenire solo tramite RFLP reali del prodotto PCR (Tab. 9; Fig. 31).
- ✓ *Rumex dwarf* phytoplasma isolate SN2 (Acc. N. JQ181551), è risultato identico, con un coefficiente di similarità 1, al profilo del ceppo tipo del gruppo 16SrI, sottogruppo B (NC005303: Onion yellows phytoplasma OY-M) (Tab. 9; Fig. 32). Pertanto, si può affermare che il nostro fitoplasma appartiene al gruppo 16SrI-B.
- ✓ *Spartium witches' broom* phytoplasma isolate SA (Acc. N. JQ181552), è risultato diverso da tutti i gruppi/sottogruppi finora descritti. Il più simile, con un coefficiente di similarità 0,96 ( $\leq 0,97$ ), è il profilo del ceppo tipo del gruppo 16SrX, sottogruppo D (X92869: Phytoplasma sp.). Dal profilo RFLP ottenuto per digestione con gli enzimi discriminanti *AluI* e *BstUI*, si nota che il fitoplasma oggetto di studio potrebbe rappresentare un nuovo sottogruppo all'interno del

gruppo 16SrX ma l'accertamento definitivo può avvenire solo tramite RFLP reali del prodotto PCR (Tab. 9; Fig. 32).

- ✓ *Spartium witches' broom* phytoplasma isolate CB (Acc. N. JQ181553), è risultato diverso da tutti i gruppi/sottogruppi finora descritti. Il più simile, con un coefficiente di similarità 0,97 ( $\leq 0,97$ ), è il profilo del ceppo tipo del gruppo 16SrX, sottogruppo D (X92869: *Phytoplasma* sp.). Il profilo RFLP ottenuto per digestione con l'enzima discriminante BstUI, permette di affermare che questo fitoplasma potrebbe rappresentare un nuovo sottogruppo all'interno del gruppo 16SrX ma l'accertamento definitivo può avvenire solo tramite RFLP reali del prodotto PCR (Tab. 9; Fig. 32).

*Spartium witches' broom* phytoplasma isolate MS (Acc. N. JQ181554), è risultato identico, con un coefficiente di similarità 1, al profilo del ceppo tipo del gruppo 16SrV, sottogruppo C (AY197642: *Alder yellowa* phytoplasma strain ALY882) (Tab. 9; Fig. 32). Pertanto, si può affermare che il fitoplasma oggetto di studio appartiene al gruppo 16SrV-C.

Tab. 9. Tabella riassuntiva dei risultati RFLP

Query	GenBank acc. N.	F*	Type	GenBank acc. N.	Gruppo - Sottogruppo
Brassica CT	JQ181539	1	Onion yellows phytoplasma OY-M	NC005303	16SrI-B
Bois noir CG	JQ181540	0,97	Candidatus <i>Phytoplasma solani</i> isolate 2642BN	AJ964960	16Sr XII
Fedia IS	JQ181541	0,97	Onion yellows phytoplasma OY-M	NC005303	16SrI
Linaria TR	JQ181542	1	Onion yellows phytoplasma OY-M	NC005303	16SrI-B
Opuntia subulata CT	JQ181543	0,95	Cactus witches'-broom phytoplasma isolate YNO1	AJ293216	16SrII
Austrocylindropuntia CT	JQ181544	0,97	Cactus witches'-broom phytoplasma isolate YNO1	AJ293216	16SrII
Opuntia ficus-indica CT	JQ181545	0,98	Cactus witches'-broom phytoplasma strain YN06	EU099551	16SrII-I
Picris Cal	JQ181546	1	Picris echinoides yellows phytoplasma	Y16389	16SrIX-C
Rumex MR1	JQ181547	1	Onion yellows phytoplasma OY-M	NC005303	16SrI-B
Rumex SN1	JQ181548	1	Onion yellows phytoplasma OY-M	NC005303	16SrI-B
Rumex MR2	JQ181549	1	Onion yellows phytoplasma OY-M	NC005303	16SrI-B
Rumex MA	JQ181550	0,97	Onion yellows phytoplasma OY-M	NC005303	16SrI
Rumex SN2	JQ181551	1	Onion yellows phytoplasma OY-M	NC005303	16SrI-B
Spartium SA	JQ181552	0,96	<i>Phytoplasma</i> sp.	X92869	16SrX
Spartium CB	JQ181553	0,97	<i>Phytoplasma</i> sp.	X92869	16SrX
Spartium MS	JQ181554	1	Alder yellows phytoplasma strain ALY882	AY197642	16SrV-C

\*F = coefficiente di similarità

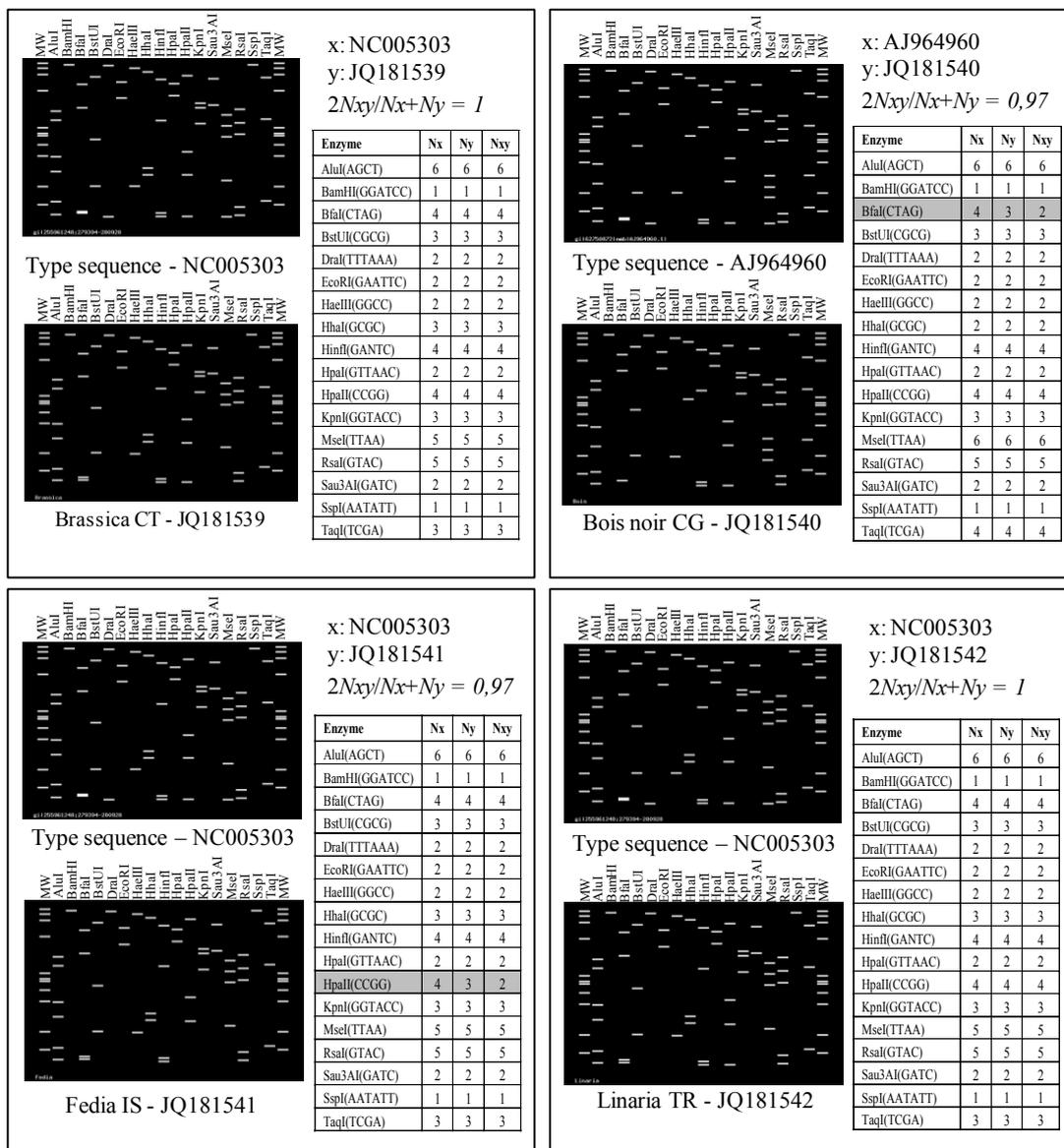


Fig. 29. Immagini dei gel virtuali dei profili RFLP R16F2nR2 ed il dettaglio di comparazione dei pattern utilizzando 17 enzimi di restrizione, tramite iPhyClassifier. MW corrisponde al marker FX174DNA, digerito dall'enzima HaeIII, con i frammenti di taglia nota 72, 118, 194, 234, 271, 281, 310, 603, 872, 1078, 1353 (bp). La formula  $F = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$  indica il coefficiente di similarità tra il ceppo tipo a più alta similarità di omologia (x) e la sequenza query (y);  $N_x$  ed  $N_y$  sono il numero totale di frammenti che risulta dalle digestioni con i 17 enzimi nei ceppi x ed y rispettivamente;  $N_{xy}$  rappresenta il numero di frammenti condivisi dai due ceppi. Nel dettaglio di comparazione dei pattern, sono evidenziati, enzima per enzima, i risultati dei profili RFLP dei due ceppi a confronto. In grigio sono visibili gli enzimi che determinano differenze tra i due ceppi. Sono qui visualizzati i profili virtuali delle sequenze query ottenute da *Brassica oleracea* subsp. *botrytis*; *Vitis vinifera* cv. Chardonnay; *Fedia cornucopiae*; *Linaria heterophylla*.

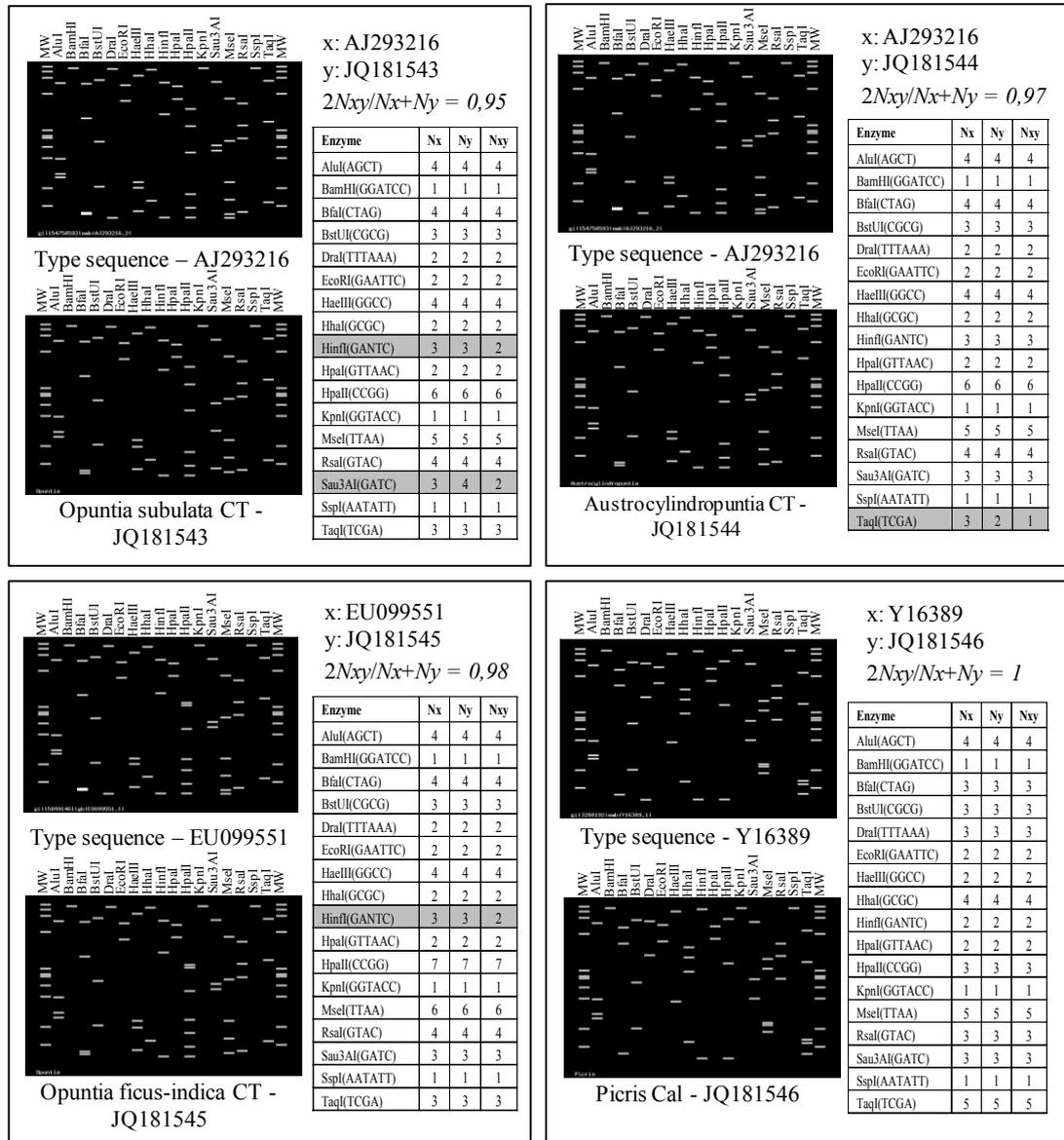


Fig. 30. Immagini dei gel virtuali dei profili RFLP R16F2nR2 ed il dettaglio di comparazione dei pattern utilizzando 17 enzimi di restrizione, tramite iPhyClassifier. MW corrisponde al marker FX174DNA, digerito dall'enzima HaeIII, con i frammenti di taglia nota 72, 118, 194, 234, 271, 281, 310, 603, 872, 1078, 1353 (bp). La formula  $F = 2N_{xy} / (N_x+N_y)$  indica il coefficiente di similarità tra il ceppo tipo a più alta similarità di omologia (x) e la sequenza query (y);  $N_x$  ed  $N_y$  sono il numero totale di frammenti che risulta dalle digestioni con i 17 enzimi nei ceppi x ed y rispettivamente;  $N_{xy}$  rappresenta il numero di frammenti condivisi dai due ceppi. Nel dettaglio di comparazione dei pattern, sono evidenziati, enzima per enzima, i risultati dei profili RFLP dei due ceppi a confronto. In grigio sono visibili gli enzimi che determinano differenze tra i due ceppi. Sono qui visualizzati i profili virtuali delle sequenze query ottenute da *Opuntia subulata* "monstruosa"; *Austrocyliandropuntia exaltata* "monstruosa"; *Opuntia ficus-indica*, *Picris echinoides*.

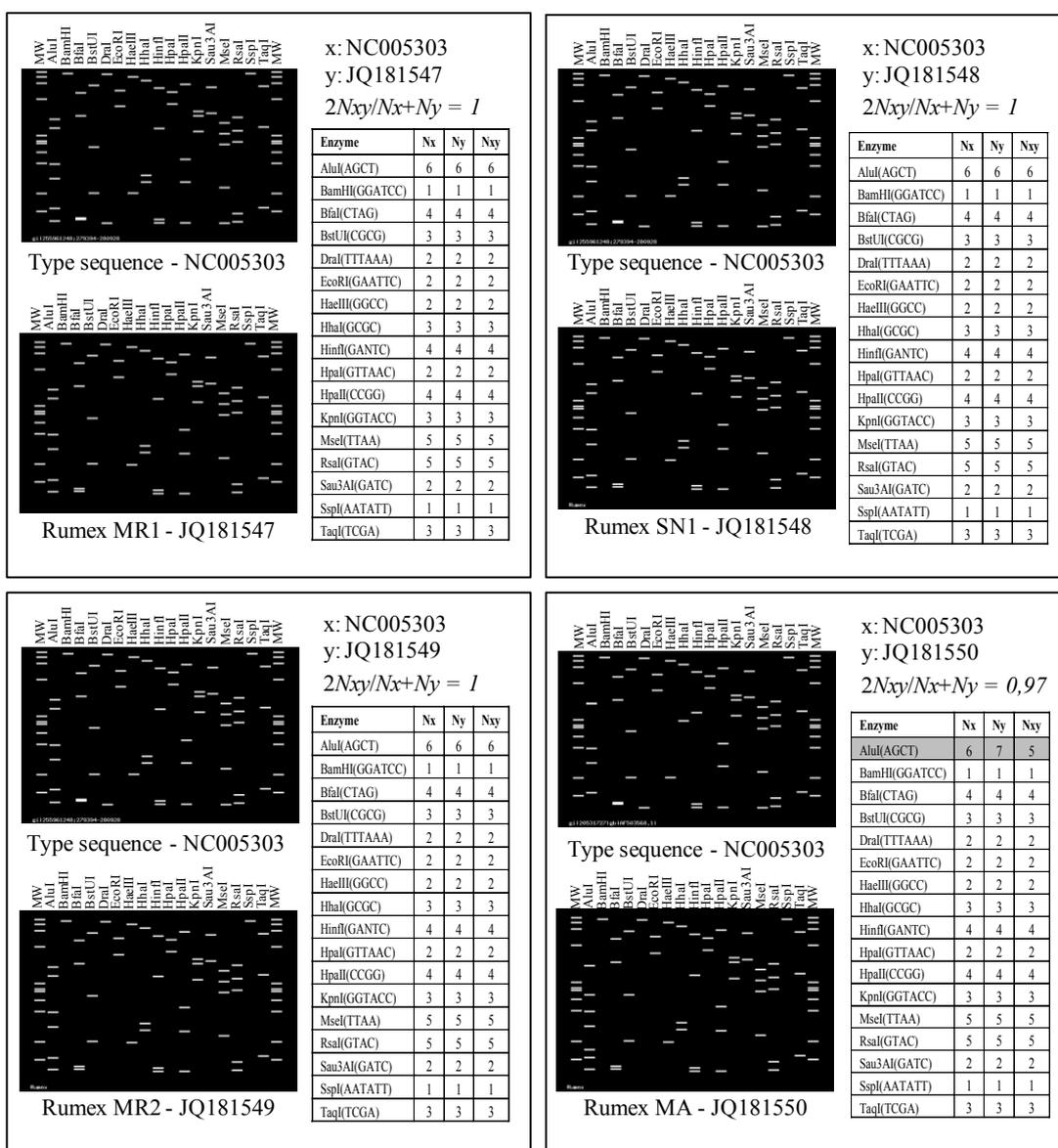


Fig. 31. Immagini dei gel virtuali dei profili RFLP R16F2nR2 ed il dettaglio di comparazione dei pattern utilizzando 17 enzimi di restrizione, tramite *iPhyClassifier*. MW corrisponde al marker FX174DNA, digerito dall'enzima *HaeIII*, con i frammenti di taglia nota 72, 118, 194, 234, 271, 281, 310, 603, 872, 1078, 1353 (bp). La formula  $F = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$  indica il coefficiente di similarità tra il ceppo tipo a più alta similarità di omologia (x) e la sequenza query (y);  $N_x$  ed  $N_y$  sono il numero totale di frammenti che risulta dalle digestioni con i 17 enzimi nei ceppi x ed y rispettivamente;  $N_{xy}$  rappresenta il numero di frammenti condivisi dai due ceppi. Nel dettaglio di comparazione dei pattern, sono evidenziati, enzima per enzima, i risultati dei profili RFLP dei due ceppi a confronto. In grigio sono visibili gli enzimi che determinano differenze tra i due ceppi. Sono qui visualizzati i profili virtuali delle sequenze query ottenute da *Rumex bucephalophorus* subsp. *bucephalophorus* (isolato Monte Rosso 1); *R. bucephalophorus* subsp. *bucephalophorus* (isolato San Nicolò 1); *R. bucephalophorus* subsp. *bucephalophorus* (isolato Monte Rosso 2); *R. bucephalophorus* subsp. *bucephalophorus* (isolato Manfria).

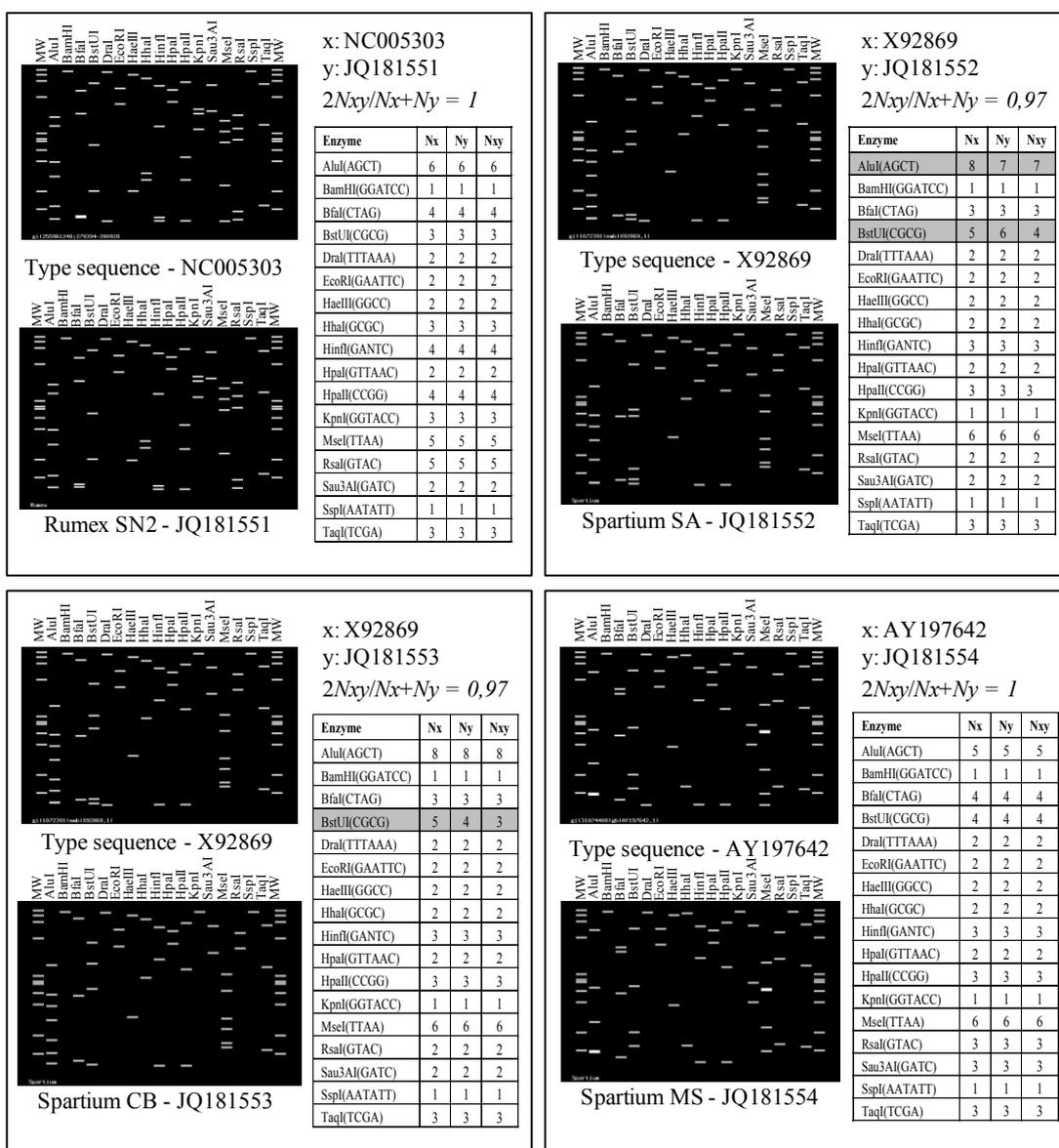


Fig. 32. Immagini dei gel virtuali dei profili RFLP R16F2nR2 ed il dettaglio di comparazione dei pattern utilizzando 17 enzimi di restrizione, tramite *iPhyClassifier*. MW corrisponde al marker FX174DNA, digerito dall'enzima *HaeIII*, con i frammenti di taglia nota 72, 118, 194, 234, 271, 281, 310, 603, 872, 1078, 1353 (bp). La formula  $F = 2N_{xy}/(N_x+N_y)$  indica il coefficiente di similarità tra il ceppo tipo a più alta similarità di omologia (x) e la sequenza query (y);  $N_x$  ed  $N_y$  sono il numero totale di frammenti che risulta dalle digestioni con i 17 enzimi nei ceppi x ed y rispettivamente;  $N_{xy}$  rappresenta il numero di frammenti condivisi dai due ceppi. Nel dettaglio di comparazione dei pattern, sono evidenziati, enzima per enzima, i risultati dei profili RFLP dei due ceppi a confronto. In grigio sono visibili gli enzimi che determinano differenze tra i due ceppi. Sono qui visualizzati i profili virtuali delle sequenze query ottenute da *Rumex bucephalophorus* subsp. *bucephalophorus* (isolato San Nicolò 2); *Spartium junceum* (isolato Salina); *S. junceum* (isolato Castelbuono), *S. junceum* (isolato Monteserra).

## 4. RICERCA DEL GENE DI PATOGENICITÀ TENGU

### 4.1 Primer specifici per il rilevamento del gene TENGU

Utilizzando i controlli positivi European aster yellow (EAY), Chrysanthemum yellow (CY), American aster yellow (AAV), Primula yellow (PY), Lettuce yellow (LY), Gladiolus yellow (GI), tutti appartenenti al gruppo I, entrambe le coppie di primer, Tenguf/r e Tenguf4d/rspec, utilizzate nelle reazioni di PCR per verificare la presenza del gene che codifica per la proteina di patogenicità TENGU, hanno prodotto risultati positivi corrispondenti ad ampliconi di 299 bp e 202 bp, rispettivamente. La coppia Tenguf/r è risultata avere maggiore efficienza con la produzione di ampliconi con maggiore concentrazione del DNA ottenuto.

Ad eccezione dell'EAY che è risultato negativo con entrambe le coppie di primer, la coppia Tenguf/r ha prodotto risultati positivi con tutti gli altri controlli, amplificando una banda specifica della taglia attesa, mentre, utilizzando la coppia Tenguf4d/rspec, anche AAV e GI sono risultati negativi.

In base all'accertamento della migliore efficienza dei primer, si è deciso di utilizzare Tenguf/r per le analisi dei campioni prelevati in campo e affetti da fitoplasmi appartenenti al gruppo 16SrI, così come accertato tramite sequenziamento del gene 16S rRNA, e che mostravano sintomi di scopazzi e/o fasciazioni.

I campioni, ottenuti da *Brassica oleracea*, *Fedia cornucopiae*, *Linaria heterophylla*, le cinque piante di *Rumex bucephalophorus* e le tre piante di *Spartium junceum*, sono risultati positivi alla presenza del gene TENGU.

Come atteso, entrambi i controlli negativi, EY ed il campione di *Rumex bucephalophorus* asintomatico, non hanno mostrato alcuna banda di amplificazione in nessuna delle PCR effettuate.

I prodotti, ottenuti mediante PCR sono stati visualizzati su gel di agarosio al 2% (Fig. 33).

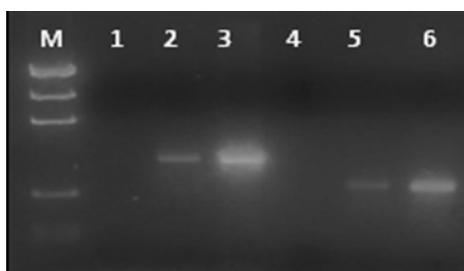


Fig. 33. Elettroforesi su gel d'agarosio 2%. 1 e 4, *Rumex bucephalophorus* asintomatico; 2 e 3, amplicone ottenuto con prime tenguf/r corrispondente *R. bucephalophorus* e CY; 5 e 6, amplicone ottenuto con prime tenguf4d/rspec corrispondente *R. bucephalophorus* e CY; M, marker Precision Molecular Mass Ruler (Bio-Rad).

## **4.2 Clonaggio e sequenziamento**

Nella fase preliminare di messa a punto del metodo PCR ed al fine di comprovare l'identità del gene, si è deciso di clonare e sequenziare gli ampliconi ottenuti dal controllo positivo *Chrysanthemum yellow phytoplasma* (CY), di cui era già nota la presenza del gene TENGU con entrambe le coppie di primer utilizzate.

Una volta visualizzate le bande corrispondenti al DNA target, su gel di agarosio al 2%, si è proceduto all'eluizione dello stesso ed alle successive fasi di clonaggio e sequenziamento, come precedentemente descritto nei paragrafi 3.4 - 3.7.

Per entrambi gli ampliconi del gene TENGU (213 bp) ottenuti dal controllo CY è stata confermata l'identità del gene, inserendo le sequenze in BLAST e confrontandole con le sequenze ad oggi depositate del gene: HM153427 (*Mulberry yellows witches'-broom phytoplasma*) con similarità del 100%; AP006628 (*Onion yellows phytoplasma*) con similarità del 99%; JF923816 (*Wheat blue dwarf phytoplasma subgroup B*) con similarità del 97%; CP000061 (*Aster yellows witches' broom phytoplasma*) con similarità del 95%.

Dall'allineamento delle due sequenze CY non è emersa alcuna differenza, confermando sia la specificità che l'efficienza di entrambe le coppie di primer.

## DISCUSSIONI

La teratologia studia, sia in zoologia che in botanica, le mostruosità o anomalie morfologiche degli esseri viventi. Con riferimento alla botanica, essa ha affascinato diversi studiosi nei secoli passati ma nell'ultimo secolo ha apparentemente destato meno interesse, tanto da essere relegata a "curiosità" per amatori o collezionisti, più che a branca scientifica.

Per quanto la registrazione di casi teratologici risalga già al 400d.C., un certo cambiamento della concezione della teratologia vegetale in botanica come studio scientifico si fa risalire all'ottocento; fino ad allora le teratologie venivano trattate dai botanici come casi curiosi e insoliti. Negli anni tra il 1869 e il 1915 l'insieme delle conoscenze sulle anomalie strutturali aumenta notevolmente e Worsdell presenta *The Principles of Plant-Teratology*, opera nella quale l'autore sposa alcune tesi su ereditarietà e ontogenesi con lo scopo non solo di essere una presentazione di interessanti e curiosi "mostri" ma di fornire anche un inedito contributo sull'origine evolutiva delle anomalie degli organi delle piante.

Fu soltanto però una svolta momentanea; successivamente e, fino ai giorni nostri, l'attività di documentazione ritorna, con l'opera di Albert Julius Otto Penzig, (*Pflanzen-Teratologie*) ad essere semplice raccolta di casi teratologici.

In parallelo, lo sviluppo degli studi di anatomia, di fisiologia e di patologia vegetale nei secoli XVI e XVII, mutò il quadro di interpretazione delle teratologie/sindromi in campo vegetale. Fino a quell'epoca, il concetto di mostruosità non si associava a quello di malattia, poiché le conoscenze sull'eziologia erano piuttosto limitate e influenzate dalle convinzioni del tempo. Qualunque osservazione riguardante piante malate o affette da strane anomalie non ebbe nessuna spiegazione, se non quella religiosa e/o legata al campo della superstizione; tale situazione rimase inalterata almeno fino alla fine del XVI secolo quando l'invenzione del microscopio consentì agli scienziati di osservare molti microrganismi precedentemente invisibili. Gli scienziati, così come i laici, divennero pertanto i primi ad ipotizzare i microrganismi come responsabili della decomposizione, malformazione e morte di tessuti ed organi umani ed animali. Da questo momento si sviluppa l'interesse per la patologia vegetale quale branca della botanica; una scienza che si sviluppa per un pratico e nobile obiettivo e cioè quello di proteggere il cibo a disposizione di uomini e animali.

Nella seconda metà del XVIII secolo, il concetto di parassitismo e dei rapporti di causalità nella determinazione delle malattie delle piante, diviene un fatto compiuto così come appare documentato nelle classiche Enciclopedie dell'epoca.

Accanto al concetto di pianta sana o normale, che può svolgere la sua normale funzione fisiologica al meglio delle sue potenzialità genetiche, in patologia vegetale

si sviluppa quello di pianta malata, nella quale le cellule non sono in grado di svolgere una o più funzioni. Raramente, però, si osserva una coincidenza tra intenti e ricerche dei teratologi con quelli dei patologi vegetali. La pianta malata e la malattia, definita quale il prodotto del mutuo conflitto e della reciproca influenza tra la pianta ed il patogeno, sono un fenomeno da studiare per identificare le cause più che un fenomeno da documentare e registrare senza identificare i meccanismi che l'hanno determinata. Nondimeno appare priva di criterio scientifico la perdita o la scarsa valorizzazione di informazioni scientifiche tanto vaste, e alla luce delle importanti spinte alla ricerca biologica data dagli studi genomici alla determinazione del fenotipo degli esseri viventi, appare interessante una rivisitazione e una modernizzazione di tale scienza. La cospicua produzione scientifica del periodo compreso tra il 1800 e 1900 rappresenta un patrimonio fondamentale delle scienze della vita e della biologia vegetale e risulta assai degna di valorizzazione tenuto conto delle nuove scoperte biologiche e molecolari.

Sulla base dello scopo generale dell'attività di ricerca, e cioè quello di proporre elementi per una rivisitazione del concetto di teratologia tramite l'interazione di studi di botanica tradizionale, patologia vegetale e biologia molecolare, sono state effettuate attività i cui risultati sono analizzati e commentati di seguito.

Il numero di casi teratologici raccolti e catalogati durante la ricerca è da considerarsi elevato in considerazione del fatto che l'attività principale è stata svolta in laboratorio per la caratterizzazione dei patogeni coinvolti. Tale constatazione permette di affermare che un'attività più intensa ed organica in questa specifica attività di ricerca porterebbe alla segnalazione di un numero molto elevato di specie vegetali mostranti teratologie sul territorio siciliano. La segnalazione di queste teratologie, soprattutto in piante spontanee allocate in aree protette, deve ancora destare interesse soprattutto alla luce della teoria iniziale che ha ispirato la definizione dello scopo della ricerca. Se, infatti, consideriamo che un fattore chiave del triangolo di alcune malattie infettive gravi riscontrate in piante coltivate, come quelle da fitoplasmi, è proprio rappresentato dalle cosiddette "piante serbatoio", cioè piante spontanee che fungono da ospite alternativo dove i vettori animali possono andare a nutrirsi accidentalmente o svernare e che una volta infettate dai fitoplasmi assumono il ruolo di fonte di inoculo, risulta interessante e per certi aspetti preoccupante il numero di piante spontanee mostranti sintomi ascrivibili a fitoplasmosi riscontrate durante questo studio. Se a questo si aggiunge che la variazione delle condizioni climatiche dell'ultimo decennio ha fatto registrare un incremento della dimensione delle popolazioni di insetti appartenenti agli auchenorrhinchi ed agli sternorrhinchi nella nostra regione, diventa ancora più critico il ruolo di queste piante nei nostri areali. A questo aspetto "applicativo" di non poca importanza si può aggiungere l'aspetto più scientifico legato alla botanica o alla teratologia in senso classico. Studi sistematici potrebbero portare ad un aumento esponenziale delle specie riportate con malformazioni o mostruosità. I risultati ottenuti in base allo studio sul materiale vegetale apre numerose prospettive e

potenzialità. Può risultare azzardato intravedere anche applicazioni negli studi dei fattori che minacciano la biodiversità delle specie vegetali ma si vuole ricordare come i patogeni da sempre hanno rappresentato fattori di erosione genetica.

Nello specifico dei risultati ottenuti dalla ricerca sono state individuate teratologie su 36 specie vegetali appartenenti a 27 generi di 16 famiglie. Tra le specie solo 4 erano utilizzate a fini produttivi (vite, mandorlo, broccolo, ficodindia) ma almeno 8 utilizzate e coltivate a fini ornamentali (*spartium* e ginestra, alcune cactacee, gelsomino) nonostante che i casi riscontrati si riferissero nella maggior parte dei casi a piante nate spontaneamente. Visto l'indirizzo dato all'attività di ricerca, la maggior parte dei quadri sintomatologici mostrava un sintomo principale di modificazione di forma di organi, ad esempio fasciazioni o scopazzi, accompagnato da sintomi secondari quali ingiallimenti e necrosi. Tali sintomi, per quanto vistosi ed interessanti, avevano quasi sempre esito negativo sulla pianta con necrosi della pianta intera o di parti di essa. L'aspetto "spettacolare" di tali forme mostruose di interesse della teratologia perde quindi di significato se interpretato in base alla patologia vegetale secondo la quale il sintomo è considerato solo come un danno per la pianta, una condizione da curare e da riportare alla normalità, normalità in cui tutti i processi fisiologici siano diretti solo dal patrimonio genetico e non da elementi estranei dannosi.

Le successive analisi miranti all'accertamento della possibile correlazione tra queste sindromi e la presenza del *Rhodococcus fascians* hanno sempre dato esito negativo, nonostante questo batterio sia considerato come un patogeno correlato a scopazzi e fasciazioni di piante erbacee ed arbustive. Questo ritrovamento coincide, però, con un nuovo studio su questo patogeno negli Stati Uniti il quale riporta che non è stato mai possibile accertare la sua presenza in piante erbacee mostranti fasciazioni (Putnam e Miller, 2007). Proprio questa pubblicazione ha di recente proposto una rivisitazione delle sindromi descritte per questo patogeno in epoche precedenti e, tra l'altro, antecedenti la scoperta dei fitoplasmi (Doi *et al.*, 1967). Le tecniche molecolari utilizzate in questa ricerca hanno consentito, inoltre, di discriminare colonie dall'apparente morfologia coincidente a quella di *R. fascians* ma appartenenti a specie non patogene per le piante (*R. kroppenstedtii*).

L'aspetto più interessante della ricerca e dei risultati ottenuti, che ha tra l'altro confermato l'ipotesi di partenza della sperimentazione, ha riguardato l'individuazione di fitoplasmi nelle piante mostranti sintomi/mostruosità appartenenti al gruppo delle modificazioni di forma. Il rilevamento di DNA fitoplasmale in 23 dei 47 campioni analizzati ha permesso di identificare 9 nuovi ospiti di fitoplasmi in Italia: *Erigeron bonariensis*, *Austrocyllindropuntia exaltata*, *Opuntia subulata*, *Euphorbia dendroides*, *E. linifolia*, *E. myrsinites*, *Rumex bucephalophorus*, *Linaria heterophylla*, *Fedia cornucopiae*; e 10 nuove associazioni tra specie e fitoplasmi: *Erigeron bonariensis* associato ad un fitoplasma del gruppo XII ma precedentemente associato in Brasile ed Argentina a fitoplasmi del gruppo VII-B (Meneguzzi *et al.*, 2008); *Austrocyllindropuntia exaltata* e *Opuntia subulata*

associate ad un fitoplasma del gruppo II ma mai precedentemente associate a fitoplasmi; *Euphorbia characias* associato ad un fitoplasma del gruppo XIV ma precedentemente associato in Italia a fitoplasmi del gruppo V (Boarino *et al.*, 2002); *Euphorbia dendroides*, *E. linifolia* ed *E. myrsinites*, associate ad un fitoplasma del gruppo XIV ma mai precedentemente associate a fitoplasmi; *Rumex bucephalophorus*, *Linaria heterophylla* e *Fedia cornucopiae* associate ad un fitoplasma del gruppo I e I-B ma mai precedentemente associate a fitoplasmi. In definitiva, dall'analisi bioinformatica delle sequenze ottenute è stato possibile identificare n. 15 fitoplasmi mai riscontrati in Sicilia e nessuna delle sequenze ottenute mostrava omologia (100% di similarità) con altre sequenze del gene 16S rRNA già depositate in GenBank. Questo ha permesso di dare un ulteriore contributo alla comunità scientifica che lavora nel nuovo settore della fitoplasmologia.

Gli studi per la classificazione dei fitoplasmi riscontrati in gruppi e sottogruppi sono stati affrontati tramite lo strumento bioinformatico del software di RFLP virtuali. Questo mezzo si è rivelato efficace e in grado di dare proiezioni virtuali realistiche della tecnica degli RFLP classici, una tecnica che nella comune pratica di laboratorio ha il limite di dovere utilizzare un range di controlli positivi (isolati tipo di ogni gruppo e sottogruppo) che nessun laboratorio al mondo possiede. La possibilità di mimare la reazione tramite l'individuazione dei siti di restrizione direttamente sulle sequenze del 16S rRNA ha permesso di assegnare i fitoplasmi riscontrati ai diversi gruppi e sottogruppi di classificazione. In base ai risultati ottenuti 8 dei fitoplasmi riscontrati appartengono al gruppo I, 6 dei quali al sottogruppo B. Tale risultato, che rappresenta anche la prima segnalazione in Sicilia di questo fitoplasma, conferma l'elevata frequenza di questo fitoplasma che può essere definito come polifago (piante ospiti differenti) anche a causa del gruppo numeroso di cicaline che lo possono tramettere. È da notare che a prescindere dalla pianta ospite la tipologia di sintomi causati da fitoplasmi del gruppo I ('*Candidatus* Phytoplasma asteris') coincide quasi sempre con scopazzi o fasciazioni (in *Brassica oleracea*, *Linaria heterophylla*, *Rumex bucephalophorus* e *Fedia cornucopia*). La presenza di questo fitoplasma, così come di altri fitoplasmi, non è mai stata precedentemente segnalata in nessuna parte del mondo per *Linaria heterophylla*, *Rumex bucephalophorus* e *Fedia cornucopia*. La presenza di fitoplasmi del gruppo I-B in *Brassica oleracea* (anche se in sottospecie differenti) è, invece, nota da tempo anche in Italia (Marcone *et al.*, 1997). Questi ritrovamenti risultano essere prime segnalazioni di associazione di fitoplasmi a queste specie.

L'associazione di fitoplasmi del gruppo I a specie mostranti sintomi di fasciazioni e scopazzi ha trovato un ulteriore approfondimento e conferma nei risultati ottenuti nello studio per l'identificazione del gene TENGU, il primo gene di patogenicità identificato su fitoplasmi e ritenuto responsabile dell'induzione di scopazzi (Hoshi *et al.*, 2009). È di notevole interesse il ritrovamento di tale gene non solo nei controlli positivi appartenenti al gruppo I utilizzati, e sui quali, a parte AY e CY, non era

ancora stata accertata la presenza del gene (EAY, CY, PY, LY, GI) ma anche in tutte le specie con sindromi di tale tipo e riscontrate successivamente affette da fitoplasmi del gruppo I (AY). Questo risultato ha consentito di studiare preliminarmente i meccanismi di determinazione di queste sindromi ed apre elevate potenzialità agli studi di interazione tra piante e fitoplasmi in un settore poco esplorato della fitoplasmologia, la patogenesi.

Le analisi molecolari per l'identificazione e classificazione dei fitoplasmi hanno permesso di identificare fitoplasmi appartenenti al gruppo II in *Austrocyllindropuntia exaltata* e *Opuntia subulata* e confermare la presenza di II-C in *Opuntia ficus-indica* (Tessitori *et al.*, 2006). Come specificato prima, questo ritrovamento rappresenta la prima segnalazione di associazione di fitoplasmi alle prime due cactacee.

A parte i fitoplasmi del gruppo I, gli altri fitoplasmi riscontrati in questo studio e che risultano segnalati per la prima volta in Sicilia sono: IX-C (*Pichris echiodes*), X (*Spartium junceum*) e V-C (*Spartium junceum*).

È da sottolineare e considerare in maniera più approfondita il ritrovamento di fitoplasmi del gruppo V-C riscontrato su ginestra comune nel sito di Monte Serra (Viagrande, CT). Mentre i fitoplasmi correlati alla stessa sindrome negli altri due siti di Castelbuono e Salina sono stati caratterizzati, così come atteso, quali appartenenti al gruppo X ('Ca. *Phytoplasma spartii*'), sono apparsi preoccupanti i risultati ottenuti per la caratterizzazione dell'isolato di Monteserra. Fitoplasmi del gruppo V-C sono responsabili di una malattia molto grave della vite, la flavescenza dorata (FD), il cui fitoplasma è trasmesso dalla cicalina ampelofaga *Scaphoideus titanus*. La flavescenza dorata è una delle più gravi malattie della vite, insieme alla malattia di Pierce causata dal procariote fastidioso *Xylella fastidiosa*, ed appartenente al gruppo dei Giallumi della vite. È un patogeno da quarantena interessato da decreto di lotta obbligatoria in Italia (DM n. 32442 del 31.5.2000). La malattia fu segnalata in forma epidemica grave per la prima volta in Francia e da lì si è mossa nelle zone vitivinicole del Nord Italia dove, da circa venti anni, causa danni gravissimi. Le prime segnalazioni di epidemie in Francia furono, inizialmente, fatte corrispondere all'introduzione in tali aree del vettore *S. titanus*, una cicalina neartica che fu introdotta in Europa tramite materiale di propagazione di vite. L'entità degli eventi epidemici, però, fece presto abbandonare l'idea che le cicaline introdotte fossero pure infette dal fitoplasma V-C. Risultati recenti di ricercatori francesi hanno, invece, fatto ipotizzare che il fitoplasma agente causale di FD fosse già presente in Francia su specie endemiche quali l'ontano, nel quale causa il giallume tipico, e viene trasmesso da *Oncopsis alni* (Schrank). Nel 2000 Maixner e collaboratori dimostrarono che *O. alni* potesse trasmettere accidentalmente il fitoplasma V-C alla vite, anche se non fosse infeudata a tale specie vegetale. Studi successivi permisero di ipotizzare che il fitoplasma V-C, agente causale della flavescenza dorata, fosse passato da ontano a vite per trasmissione accidentale tramite *O. alni* e che, una volta introdotto accidentalmente lo *S. titanus*, si fossero verificate le prime epidemie di questa malattia in Francia (Arnaud *et al.*, 2007). La velocità di diffusione di tale

malattia è infatti legata alla natura ampelofaga del suo vettore che si nutre solo su vite. Il ritrovamento di questo fitoplasma su ginestra in Sicilia rappresenta, quindi, un forte rischio potenziale per la coltura della vite soprattutto dell'areale etneo anche se al momento sarebbero necessari studi approfonditi sui vettori e sul loro potenziale ruolo nel passaggio da ginestra a vite per stimare in modo esatto il potenziale stesso.

Il numero di piante mostranti teratologie ritrovate in questo studio può aprire due diverse interpretazioni: una che, vista la natura di patogeni emergenti dei fitoplasmi, può portare ad una spiegazione collegata all'aumento delle popolazioni di cicaline osservata in Sud Italia negli ultimi 10 anni, causato da un evidente cambiamento climatico con aumento delle temperature e dell'umidità in periodi concentrati dell'anno e che può lasciare desumere un aumento esponenziale di specie che mostrano e mostreranno questi sintomi nei nostri areali con un rischio importate per le piante coltivate di interesse economico e con un aumento del rischio di erosione genetica per alcune popolazioni di specie spontanee; l'altra interpretazione dei risultati è quella più semplice che tali teratologie non erano state ricercate prima in maniera organica. La seconda ipotesi è, però, da giudicare relativamente realistica soprattutto se si considerano i dati ottenuti dallo studio preliminare delle popolazioni del fitoplasma della ginestra comune. Studi precedenti per la ricerca, affrontati dal gruppo di ricerca di questa sindrome in Sicilia, avevano portato ad individuare un solo caso mentre le osservazioni fatte in questo studio hanno dimostrato la grande diffusione di questa malattia in vari areali siciliani. Inoltre, la velocissima diffusione della malattia nel sito di Monte Serra (Viagrande, CT) osservata nei due anni di studio ha sicuramente lasciato ipotizzare la presenza di un vettore molto attivo del fitoplasma che a livello teorico potrebbe essere la *Livilla spectabilis*, di cui è stata registrata una forte infestazione nel sito. Questa psillide, l'unica infestata a ginestra comune che raramente ospita cicaline, è altamente sospettata quale agente di diffusione di tale patogeno anche sulla base delle modalità di relazione che i fitoplasmi instaurano con le psillidi. Le più gravi malattie da fitoplasmi, escludendo la flavescenza dorata della vite (patogeno da quarantena) il cui fitoplasma è trasmesso dalla cicalina *Scaphoideus titanus*, sono malattie causate da fitoplasmi del gruppo X e trasmesse da psillidi principalmente del genere *Cacopsylla*: european stone fruit yellows (ESFY), pear decline (PD) ed apple proliferation (AP) (tutte malattie da quarantena). La trasmissione tramite psillidi è oggi nota solo per i fitoplasmi del gruppo X, escludendo l'unico caso della *Bactericera trigonica* Hodkinson che può trasmettere il fitoplasma della stolbur (STOL) alla carota. Il ritrovamento in Sicilia di questi siti a forte presenza e diffusione di fitoplasmi del gruppo X in comunità di spartium rafforza, quindi, l'ipotesi del coinvolgimento della *L. spectabilis* che, in caso di accertamento della sua positività a fitoplasmi e capacità di trasmissione, diverrebbe la decima specie di psillide (le altre nove tutte appartenenti al genere *Cacopsylla*) segnalata (Jarausch B. e Jarausch W., 2010). Considerazioni simili possono essere fatte in base ai dati ottenuti su popolazioni di *Rumex bucephaloforus* mostranti sintomi e localizzate in siti differenti.

L'associazione della sindrome a fitoplasmi del gruppo I-B, uno dei più comuni fitoplasmi al mondo caratterizzato da elevata polifagia e range di insetti vettori (cicaline) molto vasto, permette ancora di ipotizzare un forte impatto dei vettori nell'apparente aumentata diffusione dei fitoplasmi e delle sindromi associate nei nostri areali.

Gli studi di caratterizzazione genomica dei fitoplasmi eventualmente associati a modificazioni di forma di *Opuntia ficus-indica* e di forme mostruose di *Austocylandropuntia exaltata* e *Opuntia subulata* hanno messo in evidenza l'associazione di fitoplasmi del gruppo II a quelle che, alla luce dell'interpretazione della patologia vegetale, sono state considerate sindromi. L'ipotesi di partenza era che succulente descritte come varietà/forme mostruose o crestate, mostranti modificazioni/sintomi potessero essere solo il risultato di infezioni da fitoplasmi e si è proceduto allo scopo di accertare la reale presenza di questi agenti patogeni in tali piante. I risultati ottenuti, per quanto preliminari, supportano l'ipotesi dell'azione dei fitoplasmi nel determinismo delle malformazioni definite, invece, in botanica, quali caratteristiche morfologiche distintive a fini tassonomici. Gli studi condotti preliminarmente possono provare solo l'associazione dei fitoplasmi alle sindromi/forme mostruose ma dovrebbero essere comprovate da studi miranti all'ottenimento della remissione dei sintomi e regressione della forma mostruosa a normale, tramite eliminazione dei fitoplasmi all'interno della pianta. L'unico modo utile ad ottenere tale effetto potrebbe essere quello di sfruttare la sensibilità dei fitoplasmi agli antibiotici del gruppo delle tetracicline. Trattamenti con tetracicline a queste piante dovrebbero determinare l'eliminazione del patogeno e il cambiamento del fenotipo in queste specie.

Si ritiene che le attività e i risultati ottenuti nell'ambito di ricerca abbiano risposto all'idea di base di questa tesi di dottorato, e cioè quella di rivalutare gli studi teratologici del passato utilizzando le nuove tecniche molecolari e sfruttando l'approccio di "risoluzione del problema" tipico della patologia vegetale, allo scopo di fornire elementi utili alla rivalutazione della teratologia per conferire nuove potenzialità a questo settore. In base ai risultati si propone un'interpretazione più "moderna" del concetto di teratologia in cui sarebbe auspicabile che vengano contemplati non solo i fenomeni ma anche le cause determinanti, la loro stabilità e la possibilità di "remissione" delle cosiddette forme mostruose a forme/fenotipi "normali".

In considerazione dell'ipotesi iniziale dell'attività di ricerca eseguita, diverse sono state le conferme ottenute e molteplici le potenzialità di sviluppo mirante alla definizione dei meccanismi di determinazione delle teratologie. L'ipotesi corrisponde ad una visione deterministica di tale scienza dove ad una causa (patogeno) corrisponda un effetto (sindrome o teratologia) e dove all'eliminazione della causa si ha la scomparsa dell'effetto che nella sua forma non è quindi stabile ma congiunturale. Si ha, cioè, una visione dinamica della "genetica" ed una coincidenza, in senso lato, con le sue nuove interpretazioni basate non sul un

concetto statico legato al DNA e al patrimonio genetico, ma sulle teorie dell'epigenetica in base alle quali il DNA e le modificazioni continue influenzate dall'ambiente determinano la specie e la sua evoluzione. I patogeni di cui ci si è occupati, da considerare come modello, rappresentano una sorta di fattore ambientale e per quanto la teoria possa sembrare ardita, hanno ben risposto all'idea di partenza: dimostrare che le teratologie possono essere forme di transizione dovute, anche, a fattori esterni e che la loro semplice catalogazione, parzialmente superata dalla concezione di Worsdell ma regredita successivamente a partire dall'opera di Penzig, non può rispondere a criteri scientifici validi.

## LETTERATURA CITATA

- Abramovitch R.B., Anderson J.C., Martini G.B., 2006. Bacterial elicitation and evasion of plant innate immunity. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7: 601-611.
- Agrios G.N., 1997. Plant diseases caused by Mollicutes: phytoplasmas and spiroplasmas. *Plant Pathology* 4: 457-470.
- Agrios G.N., 2005. *Plant Pathology*, 4<sup>th</sup> edn. Academic Press, San Diego California.
- Alma A., Conti M., 2002. Flavescenza dorata e altre fitoplasmosi della vite: il punto su vettori ed epidemiologia. *Informatore Fitopatologico* 10: 31-35.
- Al-Saady N.A., Khan A.J., Calari A., Al-Subhi A.M., Bertaccini A., 2008. 'Candidatus Phytoplasma omanense', a phytoplasma associated with witches' broom of *Cassia italica* (Mill.) Lam. in Oman. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58: 461-466.
- Arnaud G., Malembic-Maher S., Salaar P., Bonnet P., Maixner M., Marccone C., Boudon-Padieu E., Foissac X., 2007. Multilocus sequence typing confirms the close genetic interrelatedness of three distinct Flavescence dorée phytoplasma infecting grapevine and alder in Europe. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 4001-4010.
- Arocha Y., Antesana O., Montellano E., Franco P., Plata G., Jones P., 2007. 'Candidatus Phytoplasma lycopersici', a phytoplasma associated with 'hoja de perejil' disease in Bolivia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57: 1704-1710.
- Arocha Y., Lopez M., Pinol B., Fernandez M., Picornell B., Almeida R., Palenzuela I., Wilson M.R., Jones P., 2005. 'Candidatus Phytoplasma graminis' and 'Candidatus Phytoplasma caricae', two novel phytoplasmas associated with diseases of sugarcane, weeds and papaya in Cuba. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55: 2451-2463.
- Bai X.D., Correa V.R., Toruno T.Y., Ammar E.D., Kamoun S., Hogenhout S.A., 2009. AY-WB phytoplasma secretes a protein that targets plant cell nuclei. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22: 18-30.
- Baker K.F. 1950. Bacterial fasciation disease of ornamental plants in California. *Plant Dis. Rep.* 34: 121-126.
- Battisti C., Alessio G., 1975. *Dizionario etimologico italiano*. Firenze, Barbera: 3756.
- Bell K. S., Philp J. C., Aw D.W.J., Christofi N. 1998. The genus *Rhodococcus*. *Journal of Applied Microbiology* 85: 195-210.
- Belli G., 2006. *Elementi di patologia vegetale*. Piccin-Nuova Libreria.
- Berges R., Rott M., Seemüller E., 2000. Range of phytoplasma concentrations in various plant hosts as determined by competitive polymerase chain reaction. *Phytopathology* 90: 1145-1152.
- Bertaccini A., 2002. Malattie da fitoplasmi: stato dell'arte. *Petria* 12 (3): 325-343.
- Bertaccini A., 2007. Phytoplasmas: diversity, taxonomy, and epidemiology. *Frontiers of Bioscience* 12: 673-689.
- Besler B., 1613. *Hortus Eystettensis*. *Aboca Museum Edizioni*.

- Bizet C., Barreau C., Harmant C., Nowakowski M., Pietfroid A., 1997. Identification of *Rhodococcus*, *Gordona* and *Dietzia* species using carbon source utilization tests ("Biotype-100" strips). *Research in Microbiology* 148: 799-809.
- Blomquist C.L., Kirkpatrick B.C., 2001. An immunodominant membrane protein gene from the X-disease phytoplasma is distinct from those of other phytoplasmas. *Microbiology* 147: 571-580.
- Boarino A., Boccardo G., D'aquilio M., Verratti F., Marzachi C., 2002. Detection and molecular characterization of group V phytoplasmas in several herbaceous hosts. *Atti del "Workshopo"/Proceedings of the "Workshop" Petria* 12(3): 391-392.
- Bos L., 1970. Mycoplasma's een nieuw hoofdstuk in de Plantezietenkunde? *Overduik uit Gewasbesch.* 1: 45-54.
- Bottger E.C., 1989. Rapid determination of bacterial ribosomal RNA sequences by direct sequencing of enzymatically amplified DNA. *FEMS Microbiology Letters* 65: 171-176.
- Bradbury J.F., 1967. *Corynebacterium fascians*. CMI Descriptions of Pathogenic Fungi & Bacteria. N. 121. *Commonwealth Agricultural Bureaux*. The Eastern Press Ltd., London.
- Braun E.J., Sinclair W.A., 1976. Histopathology of phloem necrosis in *Ulmus americana*. *Phytopathology* 66: 598 - 607.
- Braun E.J., Sinclair W.A., 1978. Translocation in phloem necrosis-diseased America elm seedlings. *Phytopathology* 68: 1733 - 1737.
- Cai H., Chen H.R., Li F., Kong B.H., 2002. First report of a phytoplasma associated with cactus witches'-broom in Yunnan (China). *Plant Pathology* 51: 394.
- Cai H., Li F., Kong B., Chen H., 2001. Cloning and sequencing of 16S rRNA gene of Phytoplasma CWB1 strain associated with cactus witches' broom. *Wei Sheng Wu Xue Bao* 41: 693-698.
- Cai H., Wei W., Davis R.E., Chen H. Zhao, 2008. Genetic diversity among phytoplasmas infecting *Opuntia* species: virtual RFLP analysis identifies new subgroups in peanut witches'-broom phytoplasma group. *International Journal of Sistematic and Evolutionary Microbiology* 58: 1448-1457.
- Carraro L., Osler R., Loi N., Ermacora P., Refatti E. 2001. Fruit tree phytoplasma diseases diffused in nature by psyllids. *Acta Horticulturae* 550:345-350.
- Casper R., 1969. Mykoplasmen als erreger von planzenkheiten. *Nachricht. Deutsch. Pflanzenschutz.* 12: 177-182.
- Cassone F., 1850. *Flora Medico-Farmaceutica*. *Tipografia di Giuseppe Cassone*, Torino.
- Catlin P.B., Olsson E.A., Beutel, J.A., 1975. Reduced translocation of carbon and nitrogen from leaves with symptoms of pear curi. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 100: 184 - 187.
- Choi Y.H., Tapias E.C., Kim H.K., Lefeber A.W.M., Erkelens C., Verhoeven J.Th.J., Brzin J., Zel J., Verpoorte R., 2004. Metabolic discrimination of *Catharanthus roseus* leaves infected by phytoplasma using <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy and multi-variate data analysis. *Plant Physiology* 135: 2398 - 2410.
- Clair D., Larrue J., Boudon-Padieu E., 2001. Evaluation of vectoring ability of Phytoplasma by *Metcalfa pruinosa* (Say) (Homoptera: Flatidae) recently introduced in Europe. *IOBC/WPRS Bulletin* 24 (7): 195-197.
- Collaert A., 1590. *Florilegium ab Adriano Collaert et a Philippo Gallaco editum*. *Antwerpen*.

- Conti M., Vidano C., 1988. Auchenorrhinchi e trasmissione di agenti fitopatogeni in Italia. *Atti Giornate Fitopatologiche* 3: 27–50.
- Cordova I., Oropeza C., Jones P., Harrison N.A., 2002. *In situ* PCR: a technique for locating phytoplasmas in coconut embryo tissue. *Phytopathology* 92: 118.
- Cornelis K., Maes T., Jaziri M., Holsters M., Goethals K. 2002. Virulence genes of the phytopathogen *Rhodococcus fascians* show specific spatial and temporal expression patterns during plant infection *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15:398-403
- Cornelis K., Ritsema T., Nijse J., Holsters M., Goethals K., Jaziri M. 2001. The plant pathogen *Rhodococcus fascians* colonizes the exterior and interior of the aerial parts of plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14:599-608.
- Crespi M., Vereecke D., Temmerman W., Van Montagu M., Desomer J., 1994. The *fas* operon of *Rhodococcus fascians* encodes new genes required for efficient fasciation of host plants. *Journal Bacteriology* 176:2492-2501.
- Crespi, M., Messens, E., Caplan, A. B., Van Montagu, M., and Desomer, J. 1992. Fasciation induction by the phytopathogen *Rhodococcus fascians* depends upon a linear plasmid encoding a cytokinin synthase gene. *The EMBO Journal* 11:795-804.
- Cristaudo A., Galesi R., Spallino R.E., Tessitori M., 2010. Schede 12-26. In: Raimondo & Schicchi, *Quaderni di Botanica Ambientale e Applicata*, 21: 294-308.
- Cupani F., 1713. Panphyton siculum. Tomus I, Tav.121. Panormi.
- De Candolle M., 1832. Physiologie végétale. *Bèchet Jeune*, Parigi.
- Deng S. and Hiruki C., 1991. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and nonculturable Mollicutes. *Journal of Microbiological Methods* 14: 53 - 61.
- Doi Y., Teranaka M., Yora K., Asuyama H., 1967 – Mycoplasma or PLT group - like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with Mulberry dwarf, potato witches' broom, aster yellows, or Paulonia witches' broom. *Annual Phytopathology Society of Japan* 33: 259–266.
- Douglas S.M., 1986. Detection of mycoplasma-like organisms in peach and choke-cherry with X-disease by fluorescent microscopy. *Phytopathology* 76: 784-787.
- Eason J. R., Jameson P.E., Bannister P. 1995. Virulence assessment of *Rhodococcus fascians* strains on pea cultivars. *Plant Pathology* 44:141-147.
- Eason J. R., Morris R.O., Jameson P.E. 1996. The relationship between virulence and cytokinin production by *Rhodococcus fascians* (Tilford 1936) Goodfellow 1984. *Plant Pathology* 45:323-331.
- Firrao G., Gibb K., Streten C., 2005. Short taxonomic guide to the genus “*Candidatus Phytoplasma*”. *Journal of Plant Pathology* 87 (4, special issue): 249-263.
- Fletcher J., Wayadande A., Melcher U., Ye FengChun, 1998. The phytopathogenic mollicute-insect vector interface: a closer look. *Phytopathology* 88: 1351-1358.
- Fortunati L., 1995. I mostri nell'immaginario, Franco Angeli, Milano.
- Fucikovsky Zak L., Yáñez-Morales M., Alanis -Martínez I., González-Pérez E., 2011. New hosts of 16SrI phytoplasma group associated with edible *Opuntia ficus-indica* crop and its pests in Mexico. *African Journal of Microbiology Research* 5(8): 910-918.
- Gallesio G., 1817. Fico fetifero o Fico dell'osso. In: *Gallesio G., Pomona Italiana*, disp. 26. Pisa.
- Garrity, G.M., Holt. J.G., 2001. The road map to the manual, In G. M. Garrity (ed), *Bergey's manual of systematic bacteriology*: 119–166.

- Geoffroy de Saint-Hilaire I., 1847. Vie, travaux et doctrine scientifique d'Etienne Geoffroy Saint-Hilaire. P. *Bertrand éditeur*, Paris: 275.
- Gerarde J., 1597. The Erball or Generall Historie of Plantes. John Norton. London.
- Goethals K., Vereecke D., Jaziri M., Van Montagu M., Holsters M. 2001. Leafy gall formation by *Rhodococcus fascians*. *Annual Review of Phytopathology* 39: 27-52.
- Goethe J.W., 1790. La metamorfosi delle piante, cit: 27-28; cfr. WA II, 6, 2, Die Metamorphose der Pflanzen.
- Goidànich G., 1959. Manuale di Patologia vegetale. Vol. I. Edizioni agricole Bologna.
- Gouet P., Courcelle E., Stuart D.I., Metz F., 1999. ESPrint: multiple sequence alignments in PostScript. *Bioinformatics* 15: 305-308.
- Granata G., Paltrinieri S., Botti S., Bertaccini A., 2006. Aetiology of *Opuntia ficus-indica* malformations and stunting disease. *Annals of Applied Biology* 149: 317-325.
- Gürtler V., Mayall B.C., Seviour R. 2004. Can whole genome analysis refine the taxonomy of the genus *Rhodococcus*? *FEMS Microbiol. Rev.* 28: 377-403.
- Gundersen D.E., Lee I-M., Schaff D.A., Harrison N.A., Chang C.J., Davis R.E., Kinsbury D.T., 1996. Genomic diversity among phytoplasma strains in 16S rRNA Group I (Aster Yellows and related phytoplasmas) and III (X-Disease and related phytoplasmas). *International Journal of Systematic Bacteriology* 46, 64–75.
- Guthrie J.N., Walsh KR, Scott P.T., Rasmussen T.S., 2001. The phytopathology of Australian papaya dieback: a proposed role for the phytoplasma. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 58: 23 - 30.
- Hagner M., 1995. Der falsche Körper: Beiträge zu einer Geschichte der Monströsitäten. *Wallstein Verlag*, Göttingen.
- Harmsen D., Karch. H., 2004. 16S rDNA for diagnosing pathogens: a living tree. *ASM News* 70:19–24.
- Hernández-Pérez R., Noa-Carrazana J.C., Gaspar R., Mata P., Flores-Estévez N., 2009. Detection of Phytoplasma on Indian Fig (*Opuntia ficus-indica* Mill) in Mexico Central Region. *OnLine Journal of Biological Sciences* 9 (3): 62-66.
- Hogenhout S.A., Oshima K., Ammar E.-D., Kakizawa S., Kingdom H.N., Namba, S., 2008. Phytoplasmas: bacteria that manipulate plants and insects. *Molecular Plant Pathology* 9: 403-423.
- Holt J. G., Krieg N.R., Sneath P.H.A., Staley J.T., Williams S.T., 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th ed. Williams & Wilkins, Baltimore, MD.
- Hoshi A., Oshima K., Kakizawa S., Ishii Y., Ozeki J., Hashimoto M., Komatsu K., Kagiwada S., Yamaji Y., Namba S., 2008. A unique virulence factor for proliferation and dwarfism in plants identified from a phytopathogenic bacterium. *Proceeding of the National Academy of Sciences* 15(106): 6416-6421.
- Hu F.P., Fletcher M. J., Watson D.R.W., Clark R.G., Young J.M., 1992. Identification of *Rhodococcus fascians* (Tilford 1936) Goodfellow 1984. *Journal of Phytopathology* 136:37-45.
- Il'yenko O.O. 1982. Botanical properties of some species of the Scrophulariaceae family during their cultivated growth. *Ukrayins'kyi Botanichnyi Zhurnal*. 39(5):24-28 (in Ukrainian with Russian and English summaries).
- IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma working team-phytoplasma taxonomy group, 2004. Description of the genus "*Candidatus Phytoplasma*", a taxon for the wall-less non-helical

- prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54: 1243-1255.
- Ishiie T., Doi Y., Yora K., Asuyama H., 1967. Suppressive effects of antibiotics of tetracycline group on development of Mulberry dwarf disease. *Annual Phytopathology Society of Japan* 33: 267-275.
- Jacobs S. E., Mohanty U. 1951. Studies in Bacteriosis, XXVII. Factors influencing infection by *Corynebacterium fascians* (Tilford) Dowson. *Annals of Applied Biology* 38: 237-245.
- Jacobs S.E., Habish H. A., Dadd A.H. 1965. Studies on induced mutants of *Corynebacterium fascians* and on their pathogenicity in comparison with that of 'natural' strains. *Annals of Applied Biology* 56: 161-170.
- Jagueix-Eveillard S., Tarenneau F., Guoter K., Danet J.-L., Bovè J.M., Garnier M., 2001. *Chataranthus roseus* genes regulated differentially by mollicutes infections. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14, 225-233.
- Jarausch B., Jarausch W., 2010. Psyllid Vectors and their control. In *Phytoplasmas – Genomes, Plant Host and Vectors*. Phyllis G. Weintraub and Phil Jones.
- Junqueira A., Bedendo I, Pascholati S., 2004. Biochemical changes in corn plants infected by the maize bushy stunt phytoplasma. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 65: 181-185.
- Kado C., Heskett M.G., 1970. Selective medium for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology* 60: 969-976.
- Kappler C., 1983. Demoni, mostri e meraviglie alla fine del Medioevo, Sansoni, Firenze.
- Kartte S., Seemüller E., 1991a. Histopathology of apple proliferation in *Malus* taxa and hybrids of different susceptibility. *Journal of Phytopathology* 131: 149 - 160.
- Kartte S., Seemüller E., 1991b. Susceptibility of grafted *Malus* taxa and hybrids to apple proliferation disease. *Journal of Phytopathology* 131: 137-148.
- Kirkpatrick B.C., Stenger D.C., Morris T.J., Purcell A.H., 1987. Cloning and detection of DNA from a nonculturable plant pathogenic mycoplasma-like organism. *Science* 238: 197-200.
- Kirkpatrick, B.C., 1991. Mycoplasma-like organisms - plant and invertebrate pathogens. In: Balows A., Trüper H.G., Dworkin M., Harder W., Schleifer K.-S. (eds) *The Prokaryotes, Vol. M*. Springer-Verlag, New York: 4050-4067.
- Kirkpatrick B.C., 1992. Mycoplasma-like organisms: plant and invertebrate pathogens. In *The prokaryotes*, 2nd ed., pp. 4050-4067. Edited by Balows, A., Truper, H. G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K. H. New York: Springer-Verlag.
- Kison H., Seemüller E., 2001. Differences in strain virulence of the European stone fruit yellows phytoplasma and susceptibility of stone fruit trees on various rootstocks to this pathogen. *Journal of Phytopathology* 149: 533-541.
- Lacey M. S., 1939. Studies in Bacteriosis XXIV. Studies on a bacterium associated with leafy galls, fasciations and "cauliflower" disease of various plants. Part III. Further isolations, inoculation experiments and cultural studies. *Annals of Applied Biology* 26: 262-278.
- Lacey M.S., 1936a. Studies in Bacteriosis XXII. I. The isolation of a *Bacterium* associated with "fasciation" of sweet peas, "cauliflower" strawberry plants and "leafy gall" of various plants. *Annals of Applied Biology* 23:302-310.
- Lacey M.S., 1936b. Studies in Bacteriosis XXIII. Further studies on a bacterium causing fasciation of sweet peas. *Annals of Applied Biology* 23:743-751.

- Lacey M.S., 1942. Studies in Bacteriosis. XXV. Studies on a bacterium associated with leafy-galls, fasciations and 'cauliflower' disease of various plants. Part IV. The inoculation of strawberry plants with *Bacterium fascians* (Tilford.). *Annals of Applied Biology* 29: 11-15.
- Lacey M.S., 1955. The cytology and relationships of *Corynebacterium fascians*. *Transactions of the British Mycology Society* 38: 49-58.
- Lane D.J., 1991. 16S/23S rRNA sequencing. Page 115 in: Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics. E. Stackebrandt and M. Goodfellow, eds. John Wiley and Sons, NY.
- Lee I.-M., Davis R.E., Gundersen-Rindal, D.E., 2000. Phytoplasma: phytopathogenic mollicutes. *Annual Review of Microbiology* 54: 221-255.
- Lee I.-M., Gundersen-Rindal D.E., Davis R.E., Bartoszyk I.-M., 1998. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analysis of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48: 1153-1169.
- Lee I.M., Hammond R.W., Davis R.E., Gundersen D.E., 1993. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology* 83: 834-842.
- Lee I.-M., Martini M., Marcone C., Zhu S.F., 2004a. Classification of phytoplasma strains in the elm yellows group (16SrV) and proposal of 'Candidatus Phytoplasma ulmi' for the phytoplasma associated with elm yellow. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54: 337-347.
- Lee I.-M., Bottner K.D., Secor G., Rivera Varas V., 2006b. 'Candidatus Phytoplasma americanum' a phytoplasma associated with a potato purple top wilt disease complex. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56: 1593-1597.
- Lee I.-M., Davis R.E., Chen T.-A., Chiykowski L.N., Fletcher J., Hiruki C., Schaff D. A., 1992. A genotype-base system for identification and classification of mycoplasma-like organisms (MLOs) in the aster yellows MLO strain cluster. *Phytopathology* 82: 977-986
- Lee I.-M., Hammond R.W., Davis R.E., Gundersen G.E., 1993. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma like organism. *Phytopathology* 83: 834-832.
- Lee I.-M., Gundersen D.E., Hammond R.W., Davis R.E., 1994. Use of Mycoplasma-like Organism (MLO) Group-Specific Oligonucleotide Primers for Nested-PCR Assays to Detect Mixed-MLO Infections in a Single Host Plant. *Molecular Plant Pathology* 84: 559-566.
- Lee I.-M., Gundersen-Rindal D., Davis R.E., Bottner K.D., Marcone C., Seemüller E., 2004b. 'Candidatus Phytoplasma asteris', a novel taxon associated with aster yellows and related diseases. *International Journal of Systematic Bacteriology* 54: 1037-1048.
- Lee I.-M., Zhao Y., Bottner K.D., 2006a. SecY gene sequence analysis for finer differentiation of diverse strains in the aster yellows phytoplasma group. *Molecular and Cellular Probes* 20: 87-91.
- León R., Santamaría J.M., Alpizar L., Escamilla J.A., Oropeza C., 1996. Physiological and biochemical changes in shoots of coconut palms affected by lethal yellowing. *New Phytologist* 134: 227-234.
- Lepka P., Stitt M., Moll E., Seemüller E., 1999. Effect of phytoplasma infection on concentration and translocation of carbohydrates and amino acids in periwinkle and tobacco. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55: 59-68.

- Lorenz K.H., Schneider B., Ahrens U., Seemuler E., 1995. Detection of the apple proliferation and pear decline phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and nonribosomal DNA. *Phytopathology* 85: 771-776.
- Maixner M., Reinert W., Darimont H., 2000. Trasmision of grapevine yellows by *Oncopsis alni* (Schrank) (Auchenorrhyncha: Macrospine). *Vitis* 39 (2): 83-84.
- Maramorosch K., Granados R.R., Hirumi H., 1970. Mycoplasma diseases of plants and insects. *Advances in Virus Research* 16: 135-193.
- Marcone C., Ragozzino A., Schneider B., Lauer U., Smart. C.D., Seemuller E., 1996. Genetic characterization and classification of two phytoplasmas associated with spartium wjlches' broom disease. *Plant Disease* 80: 565-371.
- Marcone C., Ragozzino A., Seemüller E., 1997. Detection and identification of phytoplasmas in yellows-diseased weeds in Italy. *Plant Pathology* 46: 530-537.
- Marcone C., Gibb K.S., Streten C. e Schneider B., 2004. 'Candidatus Phytoplasma spartii', 'Candidatus Phytoplasma rhamni' and 'Candidatus Phytoplasma allocasuarinae', respectively associated with spartium witches'-broom, buckthorn witches'-broom and allocasuarina yellows diseases. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54: 1025-1029.
- Martelli G.P., 2002. Le principali virosi della vite. *Informatore fitopatologico*, 4: 18-27.
- Martini M., Botti S., Marcone C., Marzachi C., Casati P., Bianco P.A., Benedetti R., Bertaccini A., 2002. Genetic variability among Flavescence dorée phytoplasmas from different origins in Italy and France. *Molecular and Cellular probes* 16: 197-208.
- Martini M., Lee I-M., Bottner K.D., Zhao Y., Botti S., Bertaccini A., Harrison N.A., Carraro L., Marcone C., Khan J., Osler R., 2007. Ribosomal protein gene-based phylogeny for finer differentiation and classification of phytoplasmas. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57: 2037-2051.
- Marzachi C., Alma A., D'aquilio M., Minuto G., Boccardo G., 1999. Detection and identification of phytoplasmas infecting cultivated and wild plants in Liguria (Italian Riviera). *Journal of Plant Pathology* 81 (2): 127-136.
- Marzachi C., Milne R.G., Bosco D., 2004. Phytoplasma-plant relationship. In: Recent Research Development in *Plant Pathology* 3 (ed. Pandalai e Gayathry): 211-241.
- Masters M.T., 1869. Vegetable Teratology. *Ray Society*. Londra
- Maust B.E., Espadas F., Talavera C., Aguilar M., Santamaría J.M., Oropeza, C., 2003. Changes in carbohydrate metabolism in coconut palms infected with the lethal yellowing phytoplasma. *Phytopathology* 93: 976-981.
- Mazzola P., Raimondo F.M., 2011. Piante. In: Francesco Minà Palumbo. Iconografia della Storia Naturale delle Madonie, 2: 40, Tav. 16. *Sellerio editore*, Palermo.
- McCoy R.E., Caudwell A., Chang, C.J., Chen T.A., Chiykowski L.N., Cousin M.T., Dale J.L., de Leeuw G.T.N., Golin D.A., Hackett K.J., Kirkpatrick B.C., Marwitz R., Petzold H., Sinha R.C., Sugiura M., Whitcomb R.F., Yang I.L., Zhu B.M., Seemüller E., 1989. Plant diseases associated with mycoplasma-like organisms. In: Whitcomb R.F., Tully J.G. (eds.). *The Mycoplasmas* 5: 545-640.
- Meneguzzi N.G., Torres L.E., Galdeano E., Guzmàn F.A., Nome S.F., Conci L.R., 2008. Molecular characterization of a phytoplasma of the ash yellows group (16Sr VII-B) occurring in *Artemisia annua* and *Conyza bonariensis* weeds. *Agriscientia* 25: 7-15.
- Merian M.S., 1680. *Florum fasciculi très ad vivum depicti*. KK

- Miller H. J., Janse J. D., Kamerman W., Muller P. J. 1980. Recent observations on leafy gall in Liliaceae and some other families. *Neth. Journal of Plant Pathology* 86:55-68.
- Montano H.G., Davis R.E., Dally E.L., Hogenhout S.A., Pimentel J.P., Brioso P.T.S., 2001. 'Candidatus Phytoplasma brasiliense', a new phytoplasma taxon associated with hibiscus witches' broom disease. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51: 1109–1118.
- Moquin-Tandon A., 1814. *Élément de Tératologie végétale*. P.-J. Loss, Libraire-Éditeur, Parigi.
- Muncie J. H., Patel M. K. 1930. *Fasciation of sweet peas*. *American Journal of Botany* 17:218-230.
- Murray R.G.E., Schleifer K.H., 1994. Taxonomic notes: a proposal for recording the properties of putative taxa of procaryotes. *International Journal of Systematic Bacteriology* 44: 174-176.
- Musetti R., Favali M.A., Pressacco L., 2000. Histopathology and polyphenol content in plants infected by phytoplasmas. *Cytobios* 102: 133-147.
- Musetti R., Sanità di Toppi L., Martini M., Ferrini F., Loschi A., Favali M.A., Osler R., 2005. Hydrogen peroxide localization and antioxidant status in the recovery of apricot plants from European stone fruit yellows. *European Journal of Plant Pathology* 112: 53-61.
- Needham J., 1986. *Science and Civilisation in China. Biology & Biological Technology* (6). Botany Cambridge: Cambridge University of Plant Pathogenic Bacteria.
- Needleman S.B., Wunsch C.D., 1970. A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *Journal of Molecular Biology* 48: 442-453.
- Nei M., Lee W.-H., 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76: 5269-5273.
- Nicolaisen M., Horvath D.P., 2008. A branch-inducing phytoplasma in *Euphorbia pulcherrima* is associated with changes in expression of host genes. *Journal of Phytopathology* 156: 403-407.
- Orlandi G., 1983. *Temi e correnti nelle leggende di viaggio dell'Occidente altomedievale*, In Popoli e Paesi nella cultura altomedievale, *Centro Italiano di Studi sull'alto Medioevo*, Spoleto.
- Oshima K., Kakizawa S., Nishigawa H., Jung h.Y., Wei W., Suzuki S., Arashida R., Nakata D., Miyata S., Ugaki M., Namba S. 2004. Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of a plant-pathogenic phytoplasma. *Nature Genetics* 36: 27-29.
- Ottonello D., 1986. Contributi alla teratologia vegetale III. Forme teratologiche osservate in alcuni costituenti della flora spontanea ed esotica. *Atti della Accademia di scienze, Lettere e Arti di Palermo* 5 (8): 51-65.
- Ottonello D., Raimondo F.M., 1984. Contributi alla teratologia vegetale. I. Forme teratologiche osservate in alcuni costituenti della flora spontanea della Sicilia. *Naturalista Siciliano*. 4 (8): 67-92.
- Penzig O., 1890-1894. *Pflanzen-Teratologie, I-II*. Druck von Angelo Ciminago. Genua.
- Penzig O., 1921-22. *Pflanzen-Teratologie, I-III*. Verlag Von Gebrüder Borntraeger. Berlin.
- Pisabarro A., Correia A., Martin J.F., 1998. Pulsed-field gel electrophoresis analysis of the genome of *Rhodococcus fascians*: Genome size and linear and circular replicon composition in virulent and avirulent strains. *Current Microbiology* 36: 302-308.

- Plinius Secundus C. Natural History, vol. VI (XXI), (transl.W. H. S. Jones, 1951): 173. Cambridge: Harvard University.
- Ploaie P.G., 1981. Mycoplasma-like organisms and plant diseases in Europe. In: *Plant Diseases and Vectors: Ecology and Epidemiology* (ed. Maramosch e Harris, Academic press, New York): 61-104.
- Raimondo F.M., Mazzola P., 2007. Catalogo ragionato dell' *Acis Hortus Regius*. In: Napoleone C. (a cura), Fiori di Sicilia, *Acis Hortus Regius: l'Erbario di Giuseppe Riggio illustrato da Emanuele Grasso* (Acireale, 1811). Ricci, Parma, tav. III/7: 371; tav. IV/34: 389.
- Raunkiaer C., 1934. The life forms of plants and statistical plant geography. Oxford.
- Riddle C., 1903 - Fasciation. *The Ohio Naturalist* Vol. III (3): 346-348.
- Rowley G., 2006. Teratopia. Il mondo delle succulente crestate e variegatae. *Cactus & Co. libri*.
- Salehi M., Izadpanah K., Siampour M., Taghizadeh M., 2009. Molecular characterization and transmission of Bermuda Grass White Leaf Phytoplasma in Iran. *Journal of Plant Pathology* 91 (3): 655-661.
- Sambrook J., Fritsh E.F., Maniatis T., 1989. Molecular cloning: A laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory (NY)*.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceeding of the National Academy of Science* 74, 5463-5467.
- Savino V., 1985. Virosi del mandarolo. *Italia Agricola* 122 (2): 115-124.
- Schaad N. W., Jones J. B., Chun, W., 2001. Laboratory Guide for Identification.
- Schneider B., Gibb K.S., Seemüller E., 1997a. Sequence and RFLP analysis of the elongation factor Tu gene used in differentiation and classification of phytoplasmas. *Microbiology* 143: 3381-3389.
- Schneider H., 1977b. Indicator hosts for pear decline: symptomatology, histopathology, and distribution of mycoplasma-like organisms in leaf veins. *Phytopathology* 67: 592-601.
- Schneider B., Torres E., Martin M.P., Schroder M., Behnke H.D., Seemüller E., 2005. 'Candidatus Phytoplasma pini', a novel taxon from *Pinus silvestris* and *Pinus halepensis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55: 303-307.
- Sears B.B., Kirkpatrick B.C., 1994. Unveiling the evolutionary relationships of plant-pathogenic mycoplasma-like organisms. *ASM News* 60: 307-312.
- Seemüller E., Marcone C., Lauer U., Ragozzino A. & Göschl M., 1998. Current status of molecular classification of the phytoplasmas. *Journal Plant Pathology* 80: 3-26.
- Seemüller E., Garnier M., Schneider B., 2002. Mycoplasmas of plants and insects. In: *Razin, S. and Hermann, R. (eds). Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas. Kluwer Academic: 91-115.*
- Seemüller E., Schneider B., 2004. 'Candidatus Phytoplasma mali', 'Candidatus Phytoplasma pyri' and 'Candidatus Phytoplasma prunorum', the causal agents of apple proliferation, pear decline and European stone fruit yellows, respectively. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54: 1217-1226.
- Seemüller E., Schneider B., 2007. Differences in virulence and genomic features of strains of 'Candidatus Phytoplasma mali, the apple proliferation agent. *Phytopathology* 97: 964-970.
- Siddique A.B.M., Guthrie J.N., Walsh KR, White D.T., Scott P.T., 1998. Histopathology and within-plant distribution of the phytoplasma associated with Australian papaya dieback. *Plant Disease* 82: 1112-1120.

- Sinclair W.A., Griffiths H.M., 2000a. Variation in aggressiveness of ash yellows phytoplasmas. *Plant Disease* 84: 282-288.
- Sinclair W.A., Townsend A.M., Griffiths H.M., Whitlow T.H., 2000b. Responses of six Eurasian *Ulmus* cultivars to a North American elm yellows phytoplasma. *Plant Disease* 84:1266-1270.
- Smart C.D., Schneider B., Blomquist C.L., Guerra L.J., Harrison N.A., Ahrens U., Lorenz K.H., Seemuller E., Kirkpatrick B.C., 1996a. Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of the 16S-23S rRNA spacer region. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 2988-2993.
- Smart C.D., Kirkpatrick B.C., 1996b. Identification of host plant genes whose expression is altered upon aster yellows phytoplasma infections. *IOM Letters* 4: 274.
- Smith F.F., Waterman M.S., 1981. Identification of common molecular subsequences. *F. Mol. Biol.* 147: 195-197.
- Spadaro V., Bazan G., Raimondo F.M., 2010. *Schede 1-11. In: Raimondo & Schicchi, Quaderni di Botanica Ambientale e Applicata*, 21: 285-295.
- Spallino R.E., Galesi R., Tessitori M., 2011a. Teratologie osservate in piante selvatiche e coltivate in Sicilia. *106° Congresso Società Botanica Italiana*: 139.
- Spallino R.E., Oliveri C., Tessitori M., 2011b. Associazione di fitoplasmi a teratologie/sintomatologie in alcune succulente. *106° Congresso Società Botanica Italiana*: 140.
- Stange, R.R., Jeffares D., Young C., Scott B., Eason J.R., Jameson P.E. 1996. PCR amplification of the *fas-1* gene for the detection of virulent strains of *Rhodococcus fascians*. *Plant Pathology* 45: 407-417.
- Stebbins C.E., Galán J.E., 2001. Structural mimicry in bacterial virulence. *Nature* 412: 701–705.
- Suslow T.V., Schroth M.N., Isake M., 1982. Application of a rapid method for Gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. *The American Phytopathological Society* 72: 356-358.
- Takayama M., Kawai A., Suetsugu T., 1985. Studies on the diagnosis of foreign bacterial diseases of quarantine significance. V. A selective medium for isolation and detection of *Corynebacterium fascians*. *Research Bulletin of the Plant Protection Service Japan* 21: 33-40.
- Tan P.Y., Whitlow, T., 2001. Physiological responses of *Catharanthus roseus* (periwinkle) to ash yellows phytoplasma infection. *New Phytologist* 150: 757-769.
- Targioni-Tozzetti G., 1767. *De alimenta urgentia: Alimurgia, ossia modo per rendere meno gravi le carestie, proposto per il sollievo dei popoli*. Firenze.
- Tessitori M., Buonocore E., La Rosa R., 2007. Survey on virus diseases of table grape in Sicily. *Journal of Plant Pathology*, 89 (3, Supplement): 62.
- Tessitori M., Masenga V., Marzachi C., 2006. First report of a phytoplasma associated with abnormal proliferation of cladodes in cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) in Italy. *Plant Pathology* 55: 292.
- Tessitori M., Oliveri C., Spallino R.E., Cristaudo A., 2009. Ruolo e interazione di piante spontanee e patogeni vegetali. *104° Congresso Società Botanica Italiana*: 157.
- Theophrastus. *Enquiry Into Plants*, vol. II (transl. A. Hort, 1916). Heinemann, London: 39.

- Tilford P. E. 1936. Fasciation of sweet peas caused by *Phytomonas fascians* n. sp. *Journal of Agricultural Research* 53:383-394.
- Ulrychová M., Petrů E., 1983. Isolation of some strains of *Corynebacterium fascians* (Tilford) Dowson in Czechoslovakia. *Biologia Plantarum (Praha)* 25:63-67.
- Valdés-Stauber N., Scherer S., Seiler H., 1997. Identification of yeasts and coryneform bacteria from the surface microflora of brick cheeses. *International Journal of Food Microbiology* 34: 115-129.
- Valiunas D., Staniulis J., Davis R.E., 2006. 'Candidatus Phytoplasma fragariae', a novel phytoplasma taxon discovered in yellows diseased strawberry, *Fragaria x ananassa*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56: 27–281
- Vantomme R., Swings J., Goor M., Kersters K., De Ley J., 1982. Phytopathological, serological, biochemical and protein electrophoretic characterization of *Erwinia amylovora* strains isolated in Belgium. *Phytopathol Z* 103: 349±360
- Vereecke D., Burssens S., Simón-Mateo C., Inzé D., Van Montagu M., Goethals K., Jaziri M., 2000. The *Rhodococcus fascians* plant interaction: Morphological traits and biotechnical applications. *Planta* 210: 241-251.
- Vereecke D., Cornelius K., Temmerman W., Jaziri M., Van Montagu M., Holsters M., Goethals K., 2002. Chromosomal locus that affects pathogenicity of *Rhodococcus fascians*. *Journal of Bacteriology* 184: 1112-1120.
- Vereecke D., Temmerman W., Jaziri M., Holsters M., Goethals K., 2003. Toward an understanding of the *Rhodococcus fascians*- plant interaction. *Plant Microbe Interactions* (G. Stacy and N. Kean, eds.) 6: 53-58
- Vindimian M.E., Cicciotti A., Filippi M., Springhetti M., Deromedi M., 2002. Trasmissione di Apple Proliferation (AP) tramite anastomosi radicali. *Atti II Incontro Nazionale sulle Malattie da Fitoplasmii*: 31-33.
- Wei W., Lee I.-M., Davis R. E., Suo X., Zhao Y., 2007. Computer simulated RFLP analysis of 16S rRNA genes: identification of ten new phytoplasma groups. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57: 1855–1867.
- Wei W., Lee I.-M., Davis R.E., Suo X., Zhao Y., 2008. Automated RFLP pattern comparison and similarity coefficient calculation for rapid delineation of new and distinct phytoplasma 16Sr subgroup lineages. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58: 2368–2377.
- Whitcomb R.F., Davis R.E., 1970. Evidence on possible mycoplasma etiology of aster yellows disease. II Suppression of aster yellows in insect vectors. *Infection and Immunity* 2: 209-215.
- Wijnands D.O., 1993. The double-flowered *Caltha palustris*. *Euphytica* 3: 73.
- Worsdell W.C., 1915-1916. The principles of Plant Teratology. *Ray Society*. Londra.
- Zhao Y., Sun Q., Wei W., Davis R.E., Wu W., Q. Liu, 2009a. 'Candidatus Phytoplasma tamaricis', a novel taxon discovered in witches'-broom-diseased salt cedar (*Tamarix chinensis* Lour.). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59: 2496–2504.
- Zhao Y., Wei W., Davis R.E., Lee I.-M.. 2010. Recent Advances in 16S rRNA Gene-based phytoplasma differentiation, classification and taxonomy. In *Phytoplasmas – Genomes, Plant Host and Vectors*. Phyllis G. Weintraub and Phil Jones.

- Zhao Y., Wei W., Lee I-M., Shao J., Sui X., Davis R.E., 2009b. Construction of an interactive online phytoplasma classification tool, iPhyClassifier, and its application in analysis of the peach X-disease phytoplasma group (16SrIII). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59 (10): 2582–2593.
- Zheng Z., Scott S., Lukas W., Webb M., 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology* 7(1-2):203-14.

**ALLEGATO I**

**SCHEDE TERATOLOGICHE IMPLEMENTATE**

## Legenda

---

n.v.	Non visualizzato su gel di agarosio
n.e.	Non effettuato
n.r.	Non rilevabile
si	Analisi effettuata
(+)	Positivo all'analisi
(-)	Negativo all'analisi
0	Sindrome osservata su una sola pianta o individuo unico (es. collezioni presso Orti botanici)
1	Sindrome poco diffusa equivalente a $\sim \leq 20\%$
2	Sindrome diffusa equivalente a $\sim 20-50\%$
3	Sindrome molto diffusa equivalente a $\sim \geq 50\%$

---

SCHEDA NUMERO: 1	
TERATOLOGIA/SINDROME	Fasciazione settoriale accompagnata da evidente fillomania, ingiallimento e disseccamento; assenza di fiori.
SPECIE	<i>Euphorbia linifolia</i> L.
FAMIGLIA	Euphorbiaceae
NOTE COROLOGICHE	Specie W-Mediterranea
FORMA BIOLOGICA	Camefita suffruticosa / cespugliosa perenne
FASE FENOLOGICA	Fioritura
DATI SULLA FREQUENZA DEL CASO REPERTATO	0
DATI STAZIONALI	Penisola Magnisi, Priolo Gargallo (SR)
PERIODO DI RINVENIMENTO	Marzo 2009
PROTOCOLLO DI ESTRAZIONE DI ACIDI NUCLEICI TOTALI	Marzachi <i>et al.</i> , 1999
PCR + NESTED PCR	P1/P7 (n.v.) → R16F2n/R2 (-) P1/P7 (n.v.) → fU5/rU3 (+) P1/P7 (n.v.) → BGWL4f/r (+)
CLONAGGIO IN <i>ESCHERICHIA COLI</i>	n.e.
SEQUENZIAMENTO DNA FITOPLASMALE	Si (GenBank acc. N. JQ181556)
RFLP VIRTUALI	n.e.
GENE TENGU	n.e.
ISOLAMENTO BATTERICO	n.e.
PCR DNA BATTERICO	n.e.
SEQUENZIAMENTO DNA BATTERICO	n.e.
NOTE BIBLIOGRAFICHE	Masters M.T., 1869; Penzig O., 1894, 1922; Tessitori <i>et al.</i> , 2009; Cristaudo <i>et al.</i> , 2010.

#### DOCUMENTAZIONE FOTOGRAFICA



SCHEDA NUMERO: 2	
TERATOLOGIA/SINDROME	Sbiancamento, arricciamento e tomentosità delle foglie, accompagnati da espansione del rachide fogliare e proliferazione di fasci cribro-vascolari.
SPECIE	<i>Carlina gummifera</i> (L.) Less.
FAMIGLIA	Asteraceae
NOTE COROLOGICHE	Specie S-Mediterranea
FORMA BIOLOGICA	Emicriptofita rosulata / erbacea perenne
FASE FENOLOGICA	Post-fioritura
DATI SULLA FREQUENZA DEL CASO REPERTATO	2
DATI STAZIONALI	Borgo Schisina, Francavilla di Sicilia (ME)
PERIODO DI RINVENIMENTO	Aprile 2009
PROTOCOLLO DI ESTRAZIONE DI ACIDI NUCLEICI TOTALI	Marzachi <i>et al.</i> , 1999
PCR + NESTED PCR	P1/P7 (n.v.) → R16F2n/R2 (-) P1/P7 (n.v.) → fU5/rU3 (-)
CLONAGGIO IN <i>ESCHERICHIA COLI</i>	n.e.
SEQUENZIAMENTO DNA FITOPLASMALE	n.e.
RFLP VIRTUALI	n.e.
GENE TENGU	n.e.
ISOLAMENTO BATTERICO	n.e.
PCR DNA BATTERICO	n.e.
SEQUENZIAMENTO DNA BATTERICO	n.e.

NOTE BIBLIOGRAFICHE	Penzig O., 1894, 1922; Tessitori <i>et al.</i> , 2009; Cristaudo <i>et al.</i> , 2010.
---------------------	--

#### DOCUMENTAZIONE FOTOGRAFICA



SCHEDA NUMERO: 3	
TERATOLOGIA/SINDROME	Sbiancamento, arricciamento e tomentosità delle foglie, accompagnati da espansione del rachide fogliare e proliferazione di fasci cribro-vascolari.
SPECIE	<i>Carlina gummifera</i> (L.) Less.
FAMIGLIA	Asteraceae
NOTE COROLOGICHE	Specie S-Mediterranea
FORMA BIOLOGICA	Emicriptofita rosulata / erbacea perenne
FASE FENOLOGICA	Post-fioritura
DATI SULLA FREQUENZA DEL CASO REPERTATO	2
DATI STAZIONALI	Monte S. Michele, Piedimonte Etneo (CT)
PERIODO DI RINVENIMENTO	Maggio 2009
PROTOCOLLO DI ESTRAZIONE DI ACIDI NUCLEICI TOTALI	Marzachi <i>et al.</i> , 1999
PCR + NESTED PCR	P1/P7 (n.v.) → R16F2n/R2 (-) P1/P7 (n.v.) → fU5/rU3 (-)
CLONAGGIO IN <i>ESCHERICHIA COLI</i>	n.e.
SEQUENZIAMENTO DNA FITOPLASMALE	n.e.
RFLP VIRTUALI	n.e.
GENE TENGU	n.e.
ISOLAMENTO BATTERICO	n.e.
PCR DNA BATTERICO	n.e.
SEQUENZIAMENTO DNA BATTERICO	n.e.

NOTE BIBLIOGRAFICHE	Penzig O., 1894, 1922; Tessitori <i>et al.</i> , 2009; Cristaudo <i>et al.</i> , 2010.
---------------------	--

#### DOCUMENTAZIONE FOTOGRAFICA



SCHEDA NUMERO: 4	
TERATOLOGIA/SINDROME	Sbiancamento, arricciamento e delle foglie, accompagnati da espansione del rachide fogliare e proliferazione di fasci cribro-vascolari.
SPECIE	<i>Carlina gummifera</i> (L.) Less.
FAMIGLIA	Asteraceae
NOTE COROLOGICHE	Specie S-Mediterranea
FORMA BIOLOGICA	Emicriptofita rosulata / pianta erbacea perenne
FASE FENOLOGICA	Post-fioritura
DATI SULLA FREQUENZA DEL CASO REPERTATO	2
DATI STAZIONALI	Aidone (EN)
PERIODO DI RINVENIMENTO	Maggio 2009
PROTOCOLLO DI ESTRAZIONE DI ACIDI NUCLEICI TOTALI	Marzachi <i>et al.</i> , 1999
PCR + NESTED PCR	P1/P7 (n.v.) → R16F2n/R2 (-) P1/P7 (n.v.) → fU5/rU3 (-)
CLONAGGIO IN <i>ESCHERICHIA COLI</i>	n.e.
SEQUENZIAMENTO DNA FITOPLASMALE	n.e.
RFLP VIRTUALI	n.e.
GENE TENGU	n.e.
ISOLAMENTO BATTERICO	n.e.
PCR DNA BATTERICO	n.e.
SEQUENZIAMENTO DNA BATTERICO	n.e.

NOTE BIBLIOGRAFICHE	Penzig O., 1894, 1922; Tessitori <i>et al.</i> , 2009; Cristaudo <i>et al.</i> , 2010.
---------------------	--

#### DOCUMENTAZIONE FOTOGRAFICA



SCHEDA NUMERO: 5	
TERATOLOGIA/SINDROME	Fasciazione di rami dell'anno accompagnata da maculature clorotiche delle foglie, accestimento di tratti di rami e maculature necrotiche sui frutti.
SPECIE	<i>Prunus dulcis</i> (Mill.) D.A. Webb 'Ferragnes'
FAMIGLIA	Rosaceae
NOTE COROLOGICHE	Cultivar di origine orticola
FORMA BIOLOGICA	Fanerofita scaposa / albero
FASE FENOLOGICA	Fruttificazione
DATI SULLA FREQUENZA DEL CASO REPERTATO	3
DATI STAZIONALI	C.da Fontana Bianca, Delia (CL)
PERIODO DI RINVENIMENTO	Maggio 2009
PROTOCOLLO DI ESTRAZIONE DI ACIDI NUCLEICI TOTALI	Marzachi <i>et al.</i> , 1999
PCR + NESTED PCR	P1/P7 (n.v.) → R16F2n/R2 (-) P1/P7 (n.v.) → fU5/rU3 (-)
CLONAGGIO IN <i>ESCHERICHIA COLI</i>	n.e.
SEQUENZIAMENTO DNA FITOPLASMALE	n.e.
RFLP VIRTUALI	n.e.
GENE TENGU	n.e.
ISOLAMENTO BATTERICO	n.e.
PCR DNA BATTERICO	n.e.
SEQUENZIAMENTO DNA BATTERICO	n.e.

NOTE BIBLIOGRAFICHE	Penzig O., 1894, 1922; Savino V., 1985; Cristaudo <i>et. al.</i> , 2010.
---------------------	--

#### DOCUMENTAZIONE FOTOGRAFICA



SCHEDA NUMERO: 6	
TERATOLOGIA/SINDROME	Accorciamento degli internodi e sbiancamento delle foglie.
SPECIE	<i>Cynodon dactylon</i> (L.) Pers.
FAMIGLIA	Poaceae
NOTE COROLOGICHE	Specie Cosmopolita
FORMA BIOLOGICA	Geofita rizomata / erbacea perenne
FASE FENOLOGICA	Fioritura
DATI SULLA FREQUENZA DEL CASO REPERTATO	2
DATI STAZIONALI	C.da S. Nicola, Caltagirone (CT)
PERIODO DI RINVENIMENTO	Giugno 2009
PROTOCOLLO DI ESTRAZIONE DI ACIDI NUCLEICI TOTALI	Marzachi <i>et al.</i> , 1999
PCR + NESTED PCR	P1/P7 (n.v.) → R16F2n/R2 (+) P1/P7 (n.v.) → fU5/rU3 (+) P1/P7 (n.v.) → BGWL4f/r (+)
CLONAGGIO IN <i>ESCHERICHIA COLI</i>	n.e.
SEQUENZIAMENTO DNA FITOPLASMALE	n.e.
RFLP VIRTUALI	n.e.
GENE TENGU	n.e.
ISOLAMENTO BATTERICO	n.e.
PCR DNA BATTERICO	n.e.
SEQUENZIAMENTO DNA BATTERICO	n.e.

NOTE BIBLIOGRAFICHE	Salehi <i>et al.</i> , 2009; Tessitori <i>et al.</i> , 2009.
---------------------	--

#### DOCUMENTAZIONE FOTOGRAFICA



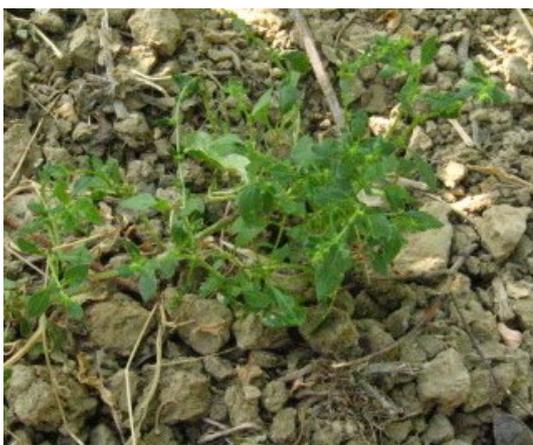
SCHEDA NUMERO: 7	
TERATOLOGIA/SINDROME	Fasciazione settoriale accompagnata da emissione di foglie di piccole dimensioni all'apice del fusto fasciato e necrosi dei tessuti.
SPECIE	<i>Euphorbia dendroides</i> L.
FAMIGLIA	Euphorbiaceae
NOTE COROLOGICHE	Specie Stenomediterranea Macaronesica
FORMA BIOLOGICA	Nanofanerofita / cespuglio, più raramente albero
FASE FENOLOGICA	Post-fioritura
DATI SULLA FREQUENZA DEL CASO REPERTATO	0
DATI STAZIONALI	Orto botanico di Catania
PERIODO DI RINVENIMENTO	Giugno 2009
PROTOCOLLO DI ESTRAZIONE DI ACIDI NUCLEICI TOTALI	Marzachi <i>et al.</i> , 1999
PCR + NESTED PCR	P1/P7 (n.v.) → R16F2n/R2 (-) P1/P7 (n.v.) → fU5/rU3 (+) P1/P7 (n.v.) → BGWLf/r (+)
CLONAGGIO IN <i>ESCHERICHIA COLI</i>	n.e.
SEQUENZIAMENTO DNA FITOPLASMALE	Si (GenBank acc. N. JQ181555)
RFLP VIRTUALI	n.e.
GENE TENGU	n.e.
ISOLAMENTO BATTERICO	n.e.
PCR DNA BATTERICO	n.e.
SEQUENZIAMENTO DNA BATTERICO	n.e.
NOTE BIBLIOGRAFICHE	Masters M.T., 1869; Penzig O., 1894, 1922; Tessitori <i>et al.</i> , 2009; Cristaudo <i>et al.</i> , 2010.

#### DOCUMENTAZIONE FOTOGRAFICA



SCHEDA NUMERO: 8	
TERATOLOGIA/SINDROME	Evidente accorciamento degli internodi accompagnato da maculature clorotiche delle foglie.
SPECIE	<i>Convolvulus arvensis</i> L.
FAMIGLIA	Convolvulaceae
NOTE COROLOGICHE	Specie Cosmopolita
FORMA BIOLOGICA	Geofita rizomata / erbacea perenne
FASE FENOLOGICA	Fioritura
DATI SULLA FREQUENZA DEL CASO REPERTATO	1
DATI STAZIONALI	C.da S. Nicola, Caltagirone (CT)
PERIODO DI RINVENIMENTO	Luglio 2009
PROTOCOLLO DI ESTRAZIONE DI ACIDI NUCLEICI TOTALI	Marzachi <i>et al.</i> , 1999
PCR + NESTED PCR	P1/P7 (n.v.) → R16F2n/R2 (+) P1/P7 (n.v.) → fU5/rU3 (+) P1/P7 (n.v.) → R16(I)F1/R1 (+)
CLONAGGIO IN <i>ESCHERICHIA COLI</i>	n.e.
SEQUENZIAMENTO DNA FITOPLASMALE	n.e.
RFLP VIRTUALI	n.e.
GENE TENGU	n.e.
ISOLAMENTO BATTERICO	n.e.
PCR DNA BATTERICO	n.e.
SEQUENZIAMENTO DNA BATTERICO	n.e.
NOTE BIBLIOGRAFICHE	Penzig O., 1894, 1922; Tessitori <i>et al.</i> , 2009.

#### DOCUMENTAZIONE FOTOGRAFICA



SCHEDA NUMERO: 9	
TERATOLOGIA/SINDROME	Clorosi settoriale delle foglie con accartocciamento lamina fogliare (foglia a triangolo). Sintomi settoriali.
SPECIE	<i>Vitis vinifera</i> L. cv. <i>Chardonnay</i>
FAMIGLIA	Vitaceae
NOTE COROLOGICHE	Cultivar di origine orticola
FORMA BIOLOGICA	Fanerofita / cespuglio
FASE FENOLOGICA	Fruttificazione
DATI SULLA FREQUENZA DEL CASO REPERTATO	1
DATI STAZIONALI	C.da S. Nicola, Caltagirone (CT)
PERIODO DI RINVENIMENTO	Luglio 2009
PROTOCOLLO DI ESTRAZIONE DI ACIDI NUCLEICI TOTALI	Marzachi <i>et al.</i> , 1999
PCR + NESTED PCR	P1/P7 (n.v.) → R16F2n/R2 (+) P1/P7 (n.v.) → fU5/rU3 (+) P1/P7 (n.v.) → R16(I)F1/R1 (+)
CLONAGGIO IN <i>ESCHERICHIA COLI</i>	n.e.
SEQUENZIAMENTO DNA FITOPLASMALE	n.e.
RFLP VIRTUALI	n.e.
GENE TENGU	n.e.
ISOLAMENTO BATTERICO	n.e.
PCR DNA BATTERICO	n.e.
SEQUENZIAMENTO DNA BATTERICO	n.e.

NOTE BIBLIOGRAFICHE	Penzig O., 1894, 1922; Ottonello D., 1986; Martelli G.P., 2002; Tessitori <i>et al.</i> , 2007.
---------------------	---

#### DOCUMENTAZIONE FOTOGRAFICA



SCHEDA NUMERO: 10	
TERATOLOGIA/SINDROME	Evidente accorciamento degli internodi; perdita dell'infiorescenza corimbosa.
SPECIE	<i>Erigeron bonariensis</i> hort. ex Link
FAMIGLIA	Asteraceae
NOTE COROLOGICHE	Specie originaria dell'America settentrionale, divenuta cosmopolita
FORMA BIOLOGICA	Terofita scaposa / erbacea annuale
FASE FENOLOGICA	Fioritura
DATI SULLA FREQUENZA DEL CASO REPERTATO	0
DATI STAZIONALI	C.da S. Nicola, Caltagirone (CT)
PERIODO DI RINVENIMENTO	Luglio 2009
PROTOCOLLO DI ESTRAZIONE DI ACIDI NUCLEICI TOTALI	Marzachi <i>et al.</i> , 1999
PCR + NESTED PCR	P1/P7(n.v.) → R16F2n/R2 (+) P1/P7 (n.v.) → fU5/rU3 (+) P1/P7 (n.v.) → R16(I)F1/R1 (+)
CLONAGGIO IN <i>ESCHERICHIA COLI</i>	n.e.
SEQUENZIAMENTO DNA FITOPLASMALE	n.e.
RFLP VIRTUALI	n.e. (16SrXII in base a primer gruppo specifici)
GENE TENGU	n.e.
ISOLAMENTO BATTERICO	n.e.
PCR DNA BATTERICO	n.e.
SEQUENZIAMENTO DNA BATTERICO	n.e.

NOTE BIBLIOGRAFICHE	Ottonello D. e Raimondo F.M., 1984; Tessitori <i>et al.</i> , 2009.
---------------------	---

#### DOCUMENTAZIONE FOTOGRAFICA



SCHEDA NUMERO: 11	
TERATOLOGIA/SINDROME	Fasciazione settoriale dei rami. Proliferazione delle gemme fiorali che, tra l'altro, si dispongono parallelamente all'apice del ramo fasciato creando, per concrenscenza, un fiore completo
SPECIE	<i>Jasminum sambac</i> (L.) Aiton
FAMIGLIA	Oleaceae
NOTE COROLOGICHE	Specie nativa dell'Asia tropicale, ampiamente coltivata a scopo ornamentale
FORMA BIOLOGICA	Fanerofita cespitosa / arbusto $\pm$ caducifoglio con rami arcuato-rampicanti
FASE FENOLOGICA	Fioritura
DATI SULLA FREQUENZA DEL CASO REPERTATO	0
DATI STAZIONALI	Giardino nel centro storico di Catania
PERIODO DI RINVENIMENTO	Agosto 2009
PROTOCOLLO DI ESTRAZIONE DI ACIDI NUCLEICI TOTALI	n.e.
PCR + NESTED PCR	n.e.
CLONAGGIO IN <i>ESCHERICHIA COLI</i>	n.e.
SEQUENZIAMENTO DNA FITOPLASMALE	n.e.
RFLP VIRTUALI	n.e.
GENE TENGU	n.e.
ISOLAMENTO BATTERICO	n.e.
PCR DNA BATTERICO	n.e.
SEQUENZIAMENTO DNA BATTERICO	n.e.
NOTE BIBLIOGRAFICHE	Penzig O., 1894, 1922; Ottonello D., 1986; Cristaudo <i>et. al.</i> ,2010.

#### DOCUMENTAZIONE FOTOGRAFICA



SCHEDA NUMERO: 12	
TERATOLOGIA/SINDROME	Accorciamento degli internodi, accompagnata da blastomania.
SPECIE	<i>Euphorbia linifolia</i> L.
FAMIGLIA	Euphorbiaceae
NOTE COROLOGICHE	Specie W-Mediterranea
FORMA BIOLOGICA	Camefita suffruticosa / cespugliosa perenne
FASE FENOLOGICA	Pre-fioritura
DATI SULLA FREQUENZA DEL CASO REPERTATO	0
DATI STAZIONALI	Penisola Magnisi, Priolo Gargallo (SR)
PERIODO DI RINVENIMENTO	Settembre 2009
PROTOCOLLO DI ESTRAZIONE DI ACIDI NUCLEICI TOTALI	Marzachi <i>et al.</i> , 1999
PCR + NESTED PCR	P1/P7 (n.v.) → R16F2n/R2 (-) P1/P7 (n.v.) → fU5/rU3 (-)
CLONAGGIO IN <i>ESCHERICHIA COLI</i>	n.e.
SEQUENZIAMENTO DNA FITOPLASMALE	n.e.
RFLP VIRTUALI	n.e.
GENE TENGU	n.e.
ISOLAMENTO BATTERICO	n.e.
PCR DNA BATTERICO	n.e.
SEQUENZIAMENTO DNA BATTERICO	n.e.

NOTE BIBLIOGRAFICHE	Masters M.T., 1869; Penzig O., 1894, 1922; Cristaudo <i>et al.</i> , 2010.
---------------------	--

#### DOCUMENTAZIONE FOTOGRAFICA



SCHEDA NUMERO: 13	
TERATOLOGIA/SINDROME	Fasciazione settoriale accompagnata da proliferazione di foglie modificate nella forma e dimensione.
SPECIE	<i>Euphorbia myrsinites</i> L.
FAMIGLIA	Euphorbiaceae
NOTE COROLOGICHE	Specie S-Europea-Pontica
FORMA BIOLOGICA	Camefito reptante / cespuglio
FASE FENOLOGICA	Fioritura
DATI SULLA FREQUENZA DEL CASO REPERTATO	0
DATI STAZIONALI	Pizzo Carbonara, Madonie (PA)
PERIODO DI RINVENIMENTO	Settembre 2009
PROTOCOLLO DI ESTRAZIONE DI ACIDI NUCLEICI TOTALI	Marzachi <i>et al.</i> , 1999
PCR + NESTED PCR	P1/P7 (n.v.) → R16F2n/R2 (-) P1/P7 (n.v.) → fU5/rU3 (+) P1/P7 (n.v.) → BGWL4f/r (+)
CLONAGGIO IN <i>ESCHERICHIA COLI</i>	n.e.
SEQUENZIAMENTO DNA FITOPLASMALE	n.e.
RFLP VIRTUALI	n.e.
GENE TENGU	n.e.
ISOLAMENTO BATTERICO	n.e.
PCR DNA BATTERICO	n.e.
SEQUENZIAMENTO DNA BATTERICO	n.e.

NOTE BIBLIOGRAFICHE	Penzig O., 1894, 1922; Tessitori <i>et al.</i> , 2009; Cristaudo <i>et al.</i> , 2010.
---------------------	--

#### DOCUMENTAZIONE FOTOGRAFICA



SCHEDA NUMERO: 14	
TERATOLOGIA/SINDROME	Fasciazione dello scapo con fillomania ed alterazione della fillostassi. Anche l'infiorescenza appare fasciata con asse ripiegato.
SPECIE	<i>Verbascum thapsus</i> L.
FAMIGLIA	Scrophulariaceae
NOTE COROLOGICHE	Specie Europea-Caucasica
FORMA BIOLOGICA	Emicriptofita bienne / erbacea bienne
FASE FENOLOGICA	Fioritura
DATI SULLA FREQUENZA DEL CASO REPERTATO	0
DATI STAZIONALI	Orto botanico di Catania
PERIODO DI RINVENIMENTO	Settembre 2009
PROTOCOLLO DI ESTRAZIONE DI ACIDI NUCLEICI TOTALI	n.e.
PCR + NESTED PCR	n.e.
CLONAGGIO IN <i>ESCHERICHIA COLI</i>	n.e.
SEQUENZIAMENTO DNA FITOPLASMALE	n.e.
RFLP VIRTUALI	n.e.
GENE TENGU	n.e.
ISOLAMENTO BATTERICO	n.e.
PCR DNA BATTERICO	n.e.
SEQUENZIAMENTO DNA BATTERICO	n.e.

NOTE BIBLIOGRAFICHE	Penzig O., 1922; Il' Yenko O.O., 1982; Ottonello D. e Raimondo F.M., 1984; Tessitori <i>et al.</i> , 2009; Cristaudo <i>et. al.</i> , 2010.
---------------------	---

#### DOCUMENTAZIONE FOTOGRAFICA



SCHEDA NUMERO: 15	
TERATOLOGIA/SINDROME	Fasciazione settoriale su un ramo dell'anno precedente. Il sintomo è così grave che il ramo si curva avvolgendosi su se stesso. Riduzione del numero di spine e necrosi progressiva dei tessuti corticali e dei fasci cribro-vascolari. Dal ramo fasciato emergono getti dell'anno asintomatici.
SPECIE	<i>Pereskia grandifolia</i> Haw.
FAMIGLIA	Cactaceae
NOTE COROLOGICHE	Specie nativa del Sud America, coltivata a scopo ornamentale
FORMA BIOLOGICA	Fanerofita scaposa / arbusto
FASE FENOLOGICA	Fruttificazione
DATI SULLA FREQUENZA DEL CASO REPERTATO	0
DATI STAZIONALI	Orto botanico di Catania
PERIODO DI RINVENIMENTO	Novembre 2009
PROTOCOLLO DI ESTRAZIONE DI ACIDI NUCLEICI TOTALI	n.e.
PCR + NESTED PCR	n.e.
CLONAGGIO IN <i>ESCHERICHIA COLI</i>	n.e.
SEQUENZIAMENTO DNA FITOPLASMALE	n.e.
RFLP VIRTUALI	n.e.
GENE TENGU	n.e.
ISOLAMENTO BATTERICO	Si → <i>R. fascians</i> (-)
PCR DNA BATTERICO	530F/1492r (+) JRERIGHT/JRELEFT (-)
SEQUENZIAMENTO DNA BATTERICO	Si [GenBank acc. N. JN102572.1 = <i>Enterococcus gallinarum</i> (99%)]
NOTE BIBLIOGRAFICHE	Penzig O. 1890, 1922; Cristaudo <i>et. al.</i> , 2010.

DOCUMENTAZIONE FOTOGRAFICA



SCHEMA NUMERO: 16	
TERATOLOGIA/SINDROME	Fasciazione a carico di un pollone con conseguente torsione e ripiegamento. Dalla zona fasciata si staccano diversi rametti asintomatici. Si nota l'assenza di sintomi su altri polloni della pianta.
SPECIE	<i>Phytolacca dioica</i> L.
FAMIGLIA	Phytolaccaceae
NOTE COROLOGICHE	Specie nativa del Sud America
FORMA BIOLOGICA	Fanerofita scaposa / albero semideciduo
FASE FENOLOGICA	Fruttificazione
DATI SULLA FREQUENZA DEL CASO REPERTATO	0
DATI STAZIONALI	Orto botanico di Catania
PERIODO DI RINVENIMENTO	Novembre 2009
PROTOCOLLO DI ESTRAZIONE DI ACIDI NUCLEICI TOTALI	n.e.
PCR + NESTED PCR	n.e.
CLONAGGIO IN <i>ESCHERICHIA COLI</i>	n.e.
SEQUENZIAMENTO DNA FITOPLASMALE	n.e.
RFLP VIRTUALI	n.e.
GENE TENGU	n.e.
ISOLAMENTO BATTERICO	n.e.
PCR DNA BATTERICO	n.e.
SEQUENZIAMENTO DNA BATTERICO	n.e.

NOTE BIBLIOGRAFICHE	Penzig O., 1894; Riddle C., 1903; Penzig O., 1922; Cristaudo <i>et. al.</i> , 2010.
---------------------	---

#### DOCUMENTAZIONE FOTOGRAFICA



SCHEDA NUMERO: 17	
TERATOLOGIA/SINDROME	Fasciazione con distorsione di un ramo con proliferazione di foglie apparentemente normali. Blastomania nella parte apicale del ramo malformato.
SPECIE	<i>Pararchidendron pruinosum</i> (Benth.) I.C. Nielsen
FAMIGLIA	Fabaceae
NOTE COROLOGICHE	Specie nativa dell'Australia e Nuova Guinea.
FORMA BIOLOGICA	Fanerofita scaposa / albero
FASE FENOLOGICA	Post-fruttificazione
DATI SULLA FREQUENZA DEL CASO REPERTATO	0
DATI STAZIONALI	Orto botanico di Catania
PERIODO DI RINVENIMENTO	Novembre 2009
PROTOCOLLO DI ESTRAZIONE DI ACIDI NUCLEICI TOTALI	n.e.
PCR + NESTED PCR	n.e.
CLONAGGIO IN <i>ESCHERICHIA COLI</i>	n.e.
SEQUENZIAMENTO DNA FITOPLASMALE	n.e.
RFLP VIRTUALI	n.e.
GENE TENGU	n.e.
ISOLAMENTO BATTERICO	n.e.
PCR DNA BATTERICO	n.e.
SEQUENZIAMENTO DNA BATTERICO	n.e.
NOTE BIBLIOGRAFICHE	Penzig O., 1894, 1922; Cristaudo <i>et. al.</i> ,2010.

DOCUMENTAZIONE FOTOGRAFICA



SCHEDA NUMERO: 18	
TERATOLOGIA/SINDROME	Fasciazione settoriale accompagnata da ingiallimento del fusto.
SPECIE	<i>Brassica oleracea</i> L. subsp. <i>botrytis</i> (L.) Metzg.
FAMIGLIA	Brassicaceae
NOTE COROLOGICHE	Specie originaria delle coste atlantiche dell'Europa dove è endemica
FORMA BIOLOGICA	Camefita suffruticosa / pianta coltivata anche bienne
FASE FENOLOGICA	Fioritura
DATI SULLA FREQUENZA DEL CASO REPERTATO	1
DATI STAZIONALI	Azienda agraria Valdisavoia, Catania
PERIODO DI RINVENIMENTO	Febbraio 2010
PROTOCOLLO DI ESTRAZIONE DI ACIDI NUCLEICI TOTALI	Marzachi <i>et al.</i> , 1999
PCR + NESTED PCR	P1/16S-SR (n.v.) → R16F2n/R2 (+) P1/16S-SR (n.v.) → fU5/rU3 (+)
CLONAGGIO IN <i>ESCHERICHIA COLI</i>	Si
SEQUENZIAMENTO DNA FITOPLASMALE	Si (GenBank acc. N. JQ181539)
RFLP VIRTUALI	16SrI-B
GENE TENGU	Tengu f/r (+)
ISOLAMENTO BATTERICO	Si → <i>R. fascians</i> (-)
PCR DNA BATTERICO	n.e.
SEQUENZIAMENTO DNA BATTERICO	n.e.

NOTE BIBLIOGRAFICHE	Penzig O., 1894, 1922; Spallino <i>et al.</i> , 2011a.
---------------------	--

#### DOCUMENTAZIONE FOTOGRAFICA



SCHEDA NUMERO: 19	
TERATOLOGIA/SINDROME	Evidente fasciazione accompagnata da fillomania. Per effetto della fasciazione, l'infiorescenza perde la tipica struttura racemosa ed i fiori (apparentemente fertili) si dispongono tutti nella parte sommitale dello scapo fiorale.
SPECIE	<i>Echium plantagineum</i> L.
FAMIGLIA	Boraginaceae
NOTE COROLOGICHE	Specie Eurimediterranea
FORMA BIOLOGICA	Terofita scaposa / erbacea bienne
FASE FENOLOGICA	Fioritura
DATI SULLA FREQUENZA DEL CASO REPERTATO	0
DATI STAZIONALI	Gorgi Tondi, Mazara del Vallo (TP)
PERIODO DI RINVENIMENTO	Marzo 2010
PROTOCOLLO DI ESTRAZIONE DI ACIDI NUCLEICI TOTALI	Marzachi <i>et al.</i> , 1999
PCR + NESTED PCR	P1/16S-SR (n.v.) → R16F2n/R2(-) P1/16S-SR (n.v.) → fU5/rU3(-)
CLONAGGIO IN <i>ESCHERICHIA COLI</i>	n.e.
SEQUENZIAMENTO DNA FITOPLASMALE	n.e.
RFLP VIRTUALI	n.e.
GENE TENGU	n.e.
ISOLAMENTO BATTERICO	Si → <i>R. fascians</i> (-)
PCR DNA BATTERICO	530f/1492r (+) JRERIGHT/JRELEFT (-)
SEQUENZIAMENTO DNA BATTERICO	Si [GenBank acc. N. EU977670.1 = <i>Rhodococcus kroppenstedtii</i> (99%)]

NOTE BIBLIOGRAFICHE	Penzig O., 1894, 1922; Ottonello D. e Raimondo F. M., 1984; Cristaudo <i>et al.</i> , 2010; Spallino <i>et al.</i> , 2011a.
---------------------	---

#### DOCUMENTAZIONE FOTOGRAFICA



SCHEDA NUMERO: 20	
TERATOLOGIA/SINDROME	Evidente accorciamento degli internodi accompagnato da virescenza e leggera fasciazione; fiori sterili.
SPECIE	<i>Fedia cornucopiae</i> (L.) Gaertner
FAMIGLIA	Valerianaceae
NOTE COROLOGICHE	Specie Steno-Mediterranea
FORMA BIOLOGICA	Terofita scaposa / erbacea annuale
FASE FENOLOGICA	Fioritura
DATI SULLA FREQUENZA DEL CASO REPERTATO	1
DATI STAZIONALI	C.da Puntara, Ispica (RG)
PERIODO DI RINVENIMENTO	Marzo 2010
PROTOCOLLO DI ESTRAZIONE DI ACIDI NUCLEICI TOTALI	Marzachi <i>et al.</i> , 1999
PCR + NESTED PCR	P1/16S-SR (n.v.) → R16F2n/R2 (+) P1/16S-SR (n.v.) → fU5/rU3 (+)
CLONAGGIO IN <i>ESCHERICHIA COLI</i>	Si
SEQUENZIAMENTO DNA FITOPLASMALE	Si (GenBank acc. N. JQ181541)
RFLP VIRTUALI	16SrI-B
GENE TENGU	Tengu f/r (+)
ISOLAMENTO BATTERICO	n.e.
PCR DNA BATTERICO	n.e.
SEQUENZIAMENTO DNA BATTERICO	n.e.

NOTE BIBLIOGRAFICHE	Penzig O., 1894, 1922; Spallino <i>et al.</i> , 2011a.
---------------------	--

#### DOCUMENTAZIONE FOTOGRAFICA



SCHEDA NUMERO: 21	
TERATOLOGIA/SINDROME	Fusto con evidente accorciamento degli internodi; l'infiorescenza non si sviluppa su brattee.
SPECIE	<i>Bellardia trixago</i> (L.) All.
FAMIGLIA	Scrophulariaceae
NOTE COROLOGICHE	Specie Eurimediterranea
FORMA BIOLOGICA	Terofita scaposa / erbacea annuale
FASE FENOLOGICA	Fioritura
DATI SULLA FREQUENZA DEL CASO REPERTATO	0
DATI STAZIONALI	Lavinaio, Monterosso (CT)
PERIODO DI RINVENIMENTO	Maggio 2010
PROTOCOLLO DI ESTRAZIONE DI ACIDI NUCLEICI TOTALI	Marzachi <i>et al.</i> , 1999
PCR + NESTED PCR	P1/16S-SR (n.v.) → R16F2n/R2(-) P1/16S-SR (n.v.) → fU5/rU3(-)
CLONAGGIO IN <i>ESCHERICHIA COLI</i>	n.e.
SEQUENZIAMENTO DNA FITOPLASMALE	n.e.
RFLP VIRTUALI	n.e.
GENE TENGU	n.e.
ISOLAMENTO BATTERICO	n.e.
PCR DNA BATTERICO	n.e.
SEQUENZIAMENTO DNA BATTERICO	n.e.

NOTE BIBLIOGRAFICHE	Spallino <i>et al.</i> , 2011a.
---------------------	---------------------------------

#### DOCUMENTAZIONE FOTOGRAFICA



SCHEDA NUMERO: 22	
TERATOLOGIA/SINDROME	Fasciazione del fusto e dello scapo florale; i fiori proliferati si dispongono sulla parte sommitale dello scapo florale malformato.
SPECIE	<i>Linaria heterophylla</i> Desf.
FAMIGLIA	Scrophulariaceae
NOTE COROLOGICHE	Specie SW-Mediterranea
FORMA BIOLOGICA	Emicriptofita scaposa / erbacea perenne
FASE FENOLOGICA	Fioritura
DATI SULLA FREQUENZA DEL CASO REPERTATO	1
DATI STAZIONALI	Monte S. Nicolò, Trecastagni (CT)
PERIODO DI RINVENIMENTO	Maggio 2010
PROTOCOLLO DI ESTRAZIONE DI ACIDI NUCLEICI TOTALI	Marzachi <i>et al.</i> , 1999
PCR + NESTED PCR	P1/16S-SR (n.v.) → R16F2n/R2 (+) P1/16S-SR (n.v.) → fU5/rU3 (+)
CLONAGGIO IN <i>ESCHERICHIA COLI</i>	Si
SEQUENZIAMENTO DNA FITOPLASMALE	Si (GenBank acc. N. JQ181542)
RFLP VIRTUALI	16SrI-B
GENE TENGU	Tengu f/r (+)
ISOLAMENTO BATTERICO	n.e.
PCR DNA BATTERICO	n.e.
SEQUENZIAMENTO DNA BATTERICO	n.e.

NOTE BIBLIOGRAFICHE	Penzig. O., 1922; Spallino <i>et al.</i> , 2011a.
---------------------	---

#### DOCUMENTAZIONE FOTOGRAFICA



SCHEDA NUMERO: 23	
TERATOLOGIA/SINDROME	Fasciazione settoriale accompagnata da spiralizzazione del ramo. Le gemme fiorali si dispongono sul ramo malformato.
SPECIE	<i>Genista aetnensis</i> (Raf. Ex Biv.) DC.
FAMIGLIA	Fabaceae
NOTE COROLOGICHE	Specie endemica
FORMA BIOLOGICA	Fanerofita cespugliosa / fanerofita arborea
FASE FENOLOGICA	Fioritura
DATI SULLA FREQUENZA DEL CASO REPERTATO	0
DATI STAZIONALI	Monte Serra, Viagrande (CT)
PERIODO DI RINVENIMENTO	Giugno 2010
PROTOCOLLO DI ESTRAZIONE DI ACIDI NUCLEICI TOTALI	Marzachi <i>et al.</i> , 1999
PCR + NESTED PCR	P1/16S-SR (n.v.) →R16F2n/R2(-) P1/16S-SR (n.v.) →fU5/rU3(-)
CLONAGGIO IN <i>ESCHERICHIA COLI</i>	n.e.
SEQUENZIAMENTO DNA FITOPLASMALE	n.e.
RFLP VIRTUALI	n.e.
GENE TENGU	n.e.
ISOLAMENTO BATTERICO	Si → <i>R. fascians</i> (-)
PCR DNA BATTERICO	n.e.
SEQUENZIAMENTO DNA BATTERICO	n.e.

NOTE BIBLIOGRAFICHE	Penzig O., 1894, 1922; Spallino <i>et al.</i> , 2011a.
---------------------	--

#### DOCUMENTAZIONE FOTOGRAFICA



SCHEDA NUMERO: 24	
TERATOLOGIA/SINDROME	Fasciazione del fusto e fusti fioriferi raccorciati; fiori apparentemente fertili.
SPECIE	<i>Echium vulgare</i> L.
FAMIGLIA	Boraginacea
NOTE COROLOGICHE	Specie Europea
FORMA BIOLOGICA	Emicriptofita bienne /erbacea bienne
FASE FENOLOGICA	Fioritura
DATI SULLA FREQUENZA DEL CASO REPERTATO	0
DATI STAZIONALI	Monte Serra, Viagrande (CT)
PERIODO DI RINVENIMENTO	Giugno 2010
PROTOCOLLO DI ESTRAZIONE DI ACIDI NUCLEICI TOTALI	Marzachi <i>et al.</i> , 1999
PCR + NESTED PCR	P1/16S-SR (n.v.) → R16F2n/R2(-) P1/16S-SR (n.v.) → fU5/rU3(-)
CLONAGGIO IN <i>ESCHERICHIA COLI</i>	n.e.
SEQUENZIAMENTO DNA FITOPLASMALE	n.e.
RFLP VIRTUALI	n.e.
GENE TENGU	n.e.
ISOLAMENTO BATTERICO	Si → <i>R. fascians</i> (-)
PCR DNA BATTERICO	n.e.
SEQUENZIAMENTO DNA BATTERICO	n.e.

NOTE BIBLIOGRAFICHE	Penzig O., 1894, 1922; Spallino <i>et al.</i> , 2011a.
---------------------	--

#### DOCUMENTAZIONE FOTOGRAFICA



SCHEDA NUMERO: 25	
TERATOLOGIA/SINDROME	Fasciazione settoriale; fusti fioriferi unilaterali con produzione di fiori apparentemente fertili.
SPECIE	<i>Linaria purpurea</i> (L.) Mill.
FAMIGLIA	Scrophulariaceae
NOTE COROLOGICHE	Specie SW-Mediterranea
FORMA BIOLOGICA	Emicriptofita scaposa / erbacea perenne
FASE FENOLOGICA	Fioritura
DATI SULLA FREQUENZA DEL CASO REPERTATO	0
DATI STAZIONALI	Località Cisternazza, Pedara (CT)
PERIODO DI RINVENIMENTO	Giugno 2010
PROTOCOLLO DI ESTRAZIONE DI ACIDI NUCLEICI TOTALI	Marzachi <i>et al.</i> , 1999
PCR + NESTED PCR	P1/16S-SR (n.v.) → R16F2n/R2(-) P1/16S-SR (n.v.) → fU5/rU3(-)
CLONAGGIO IN <i>ESCHERICHIA COLI</i>	n.e.
SEQUENZIAMENTO DNA FITOPLASMALE	n.e.
RFLP VIRTUALI	n.e.
GENE TENGU	n.e.
ISOLAMENTO BATTERICO	n.e.
PCR DNA BATTERICO	n.e.
SEQUENZIAMENTO DNA BATTERICO	n.e.

NOTE BIBLIOGRAFICHE	Penzig O., 1922; Spallino <i>et al.</i> , 2011a.
---------------------	--

#### DOCUMENTAZIONE FOTOGRAFICA



SCHEDA NUMERO: 26	
TERATOLOGIA/SINDROME	Proliferazione dei fiori con fasciazione delle spighe fiorali.
SPECIE	<i>Celosia plumosa</i> Hort. ex Burvenich
FAMIGLIA	Amaranthaceae
NOTE COROLOGICHE	Specie dell'Asia tropicale
FORMA BIOLOGICA	Terofita scaposa / pianta annuale
FASE FENOLOGICA	Fioritura
DATI SULLA FREQUENZA DEL CASO REPERTATO	0 (piante acquistata)
DATI STAZIONALI	n.r.
PERIODO DI RINVENIMENTO	Giugno 2010
PROTOCOLLO DI ESTRAZIONE DI ACIDI NUCLEICI TOTALI	Marzachi <i>et al.</i> , 1999
PCR + NESTED PCR	P1/16S-SR (n.v.) → R16F2n/R2(-) P1/16S-SR (n.v.) → fU5/rU3(-)
CLONAGGIO IN <i>ESCHERICHIA COLI</i>	n.e.
SEQUENZIAMENTO DNA FITOPLASMALE	n.e.
RFLP VIRTUALI	n.e.
GENE TENGU	n.e.
ISOLAMENTO BATTERICO	n.e.
PCR DNA BATTERICO	n.e.
SEQUENZIAMENTO DNA BATTERICO	n.e.

NOTE BIBLIOGRAFICHE	Penzig O., 1922.
---------------------	------------------

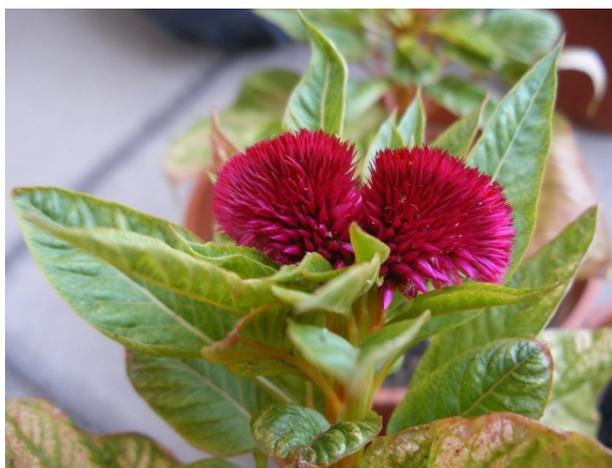
#### DOCUMENTAZIONE FOTOGRAFICA



SCHEDA NUMERO: 27	
TERATOLOGIA/SINDROME	Fasciazione del fusto e dell'infiorescenza; leggera malformazione delle foglie.
SPECIE	<i>Celosia cretata</i> L.
FAMIGLIA	Amaranthaceae
NOTE COROLOGICHE	Specie originaria dell'India
FORMA BIOLOGICA	Terofita scaposa / pianta annuale
FASE FENOLOGICA	Fioritura
DATI SULLA FREQUENZA DEL CASO REPERTATO	0
DATI STAZIONALI	n.r.
PERIODO DI RINVENIMENTO	Giugno 2010
PROTOCOLLO DI ESTRAZIONE DI ACIDI NUCLEICI TOTALI	Marzachi <i>et al.</i> , 1999
PCR + NESTED PCR	P1/16S-SR (n.v.) → R16F2n/R2(-) P1/16S-SR (n.v.) → fU5/rU3(-)
CLONAGGIO IN <i>ESCHERICHIA COLI</i>	n.e.
SEQUENZIAMENTO DNA FITOPLASMALE	n.e.
RFLP VIRTUALI	n.e.
GENE TENGU	n.e.
ISOLAMENTO BATTERICO	n.e.
PCR DNA BATTERICO	n.e.
SEQUENZIAMENTO DNA BATTERICO	n.e.

NOTE BIBLIOGRAFICHE	Penzig O., 1922.
---------------------	------------------

#### DOCUMENTAZIONE FOTOGRAFICA



SCHEDA NUMERO: 28	
TERATOLOGIA/SINDROME	Fasciazione settoriale del fusto; infiorescenza spiriforme ben distribuita.
SPECIE	<i>Echium vulgare</i> L.
FAMIGLIA	Boraginaceae
NOTE COROLOGICHE	Specie Europea
FORMA BIOLOGICA	Emicriptofita bienne / erbacea bienne
FASE FENOLOGICA	Post-fioritura
DATI SULLA FREQUENZA DEL CASO REPERTATO	1
DATI STAZIONALI	Monte S. Nicolò, Trecastagni (CT)
PERIODO DI RINVENIMENTO	Luglio 2010
PROTOCOLLO DI ESTRAZIONE DI ACIDI NUCLEICI TOTALI	Marzachi <i>et al.</i> , 1999
PCR + NESTED PCR	P1/16S-SR (n.v.) → R16F2n/R2(-) P1/16S-SR (n.v.) → fU5/rU3(-)
CLONAGGIO IN <i>ESCHERICHIA COLI</i>	n.e.
SEQUENZIAMENTO DNA FITOPLASMALE	n.e.
RFLP VIRTUALI	n.e.
GENE TENGU	n.e.
ISOLAMENTO BATTERICO	Si → <i>R. fascians</i> (-)
PCR DNA BATTERICO	n.e.
SEQUENZIAMENTO DNA BATTERICO	n.e.

NOTE BIBLIOGRAFICHE	Penzig O., 1894, 1922; Spallino <i>et al.</i> , 2011a.
---------------------	--

#### DOCUMENTAZIONE FOTOGRAFICA



SCHEDA NUMERO: 29	
TERATOLOGIA/SINDROME	Evidente fasciazione del fusto accompagnata da emissione di foglie clorotiche.
SPECIE	<i>Chenopodium album</i> L.
FAMIGLIA	Amaranthaceae
NOTE COROLOGICHE	Specie Subcosmopolita
FORMA BIOLOGICA	Terofita scaposa / erbacea annuale
FASE FENOLOGICA	Post-fioritura
DATI SULLA FREQUENZA DEL CASO REPERTATO	0
DATI STAZIONALI	Foro Italico di Palermo
PERIODO DI RINVENIMENTO	Settembre 2010
PROTOCOLLO DI ESTRAZIONE DI ACIDI NUCLEICI TOTALI	Marzachi <i>et al.</i> , 1999
PCR + NESTED PCR	P1/16S-SR (n.v.) → R16F2n/R2(-) P1/16S-SR (n.v.) → fU5/rU3(-)
CLONAGGIO IN <i>ESCHERICHIA COLI</i>	n.e.
SEQUENZIAMENTO DNA FITOPLASMALE	n.e.
RFLP VIRTUALI	n.e.
GENE TENGU	n.e.
ISOLAMENTO BATTERICO	Si → <i>R. fascians</i> (-)
PCR DNA BATTERICO	n.e.
SEQUENZIAMENTO DNA BATTERICO	n.e.

NOTE BIBLIOGRAFICHE	Penzig O., 1894, 1922; Spallino <i>et al.</i> , 2011a.
---------------------	--

#### DOCUMENTAZIONE FOTOGRAFICA



SCHEDA NUMERO: 30	
TERATOLOGIA/SINDROME	Fasciazione su rami; necrosi della terminazione dei fasci vascolari.
SPECIE	<i>Genista aetnensis</i> (Raf. Ex Biv.) DC.
FAMIGLIA	Fabaceae
NOTE COROLOGICHE	Specie endemica
FORMA BIOLOGICA	Fanerofita cespugliosa / arbusto perenne
FASE FENOLOGICA	Fruttificazione
DATI SULLA FREQUENZA DEL CASO REPERTATO	1
DATI STAZIONALI	Località Ragalidda, Nicolosi (CT)
PERIODO DI RINVENIMENTO	Settembre 2010
PROTOCOLLO DI ESTRAZIONE DI ACIDI NUCLEICI TOTALI	Marzachi <i>et al.</i> , 1999
PCR + NESTED PCR	P1/16S-SR (n.v.) → R16F2n/R2(-) P1/16S-SR (n.v.) → fU5/rU3(-)
CLONAGGIO IN <i>ESCHERICHIA COLI</i>	n.e.
SEQUENZIAMENTO DNA FITOPLASMALE	n.e.
RFLP VIRTUALI	n.e.
GENE TENGU	n.e.
ISOLAMENTO BATTERICO	Si → <i>R. fascians</i> (-)
PCR DNA BATTERICO	n.e.
SEQUENZIAMENTO DNA BATTERICO	n.e.

NOTE BIBLIOGRAFICHE	Penzig O., 1894, 1922; Spallino <i>et al.</i> , 2011a.
---------------------	--

#### DOCUMENTAZIONE FOTOGRAFICA



SCHEDA NUMERO: 31	
TERATOLOGIA/SINDROME	Fasciazione degli scapi fioriferi e proliferazione delle gemme fiorali.
SPECIE	<i>Scrophularia canina</i> subsp. <i>bicolor</i> (Sm.) Greuter
FAMIGLIA	Scrophulariaceae
NOTE COROLOGICHE	Specie eurimediterranea
FORMA BIOLOGICA	Emicriptofita scaposa / erbacea perenne
FASE FENOLOGICA	Fruttificazione
DATI SULLA FREQUENZA DEL CASO REPERTATO	0
DATI STAZIONALI	Monte Quacella, Madonie (PA)
PERIODO DI RINVENIMENTO	Luglio 2010
PROTOCOLLO DI ESTRAZIONE DI ACIDI NUCLEICI TOTALI	Marzachi <i>et al.</i> , 1999
PCR + NESTED PCR	P1/16S-SR (n.v.) → R16F2n/R2(-) P1/16S-SR (n.v.) → fU5/rU3(-)
CLONAGGIO IN <i>ESCHERICHIA COLI</i>	n.e.
SEQUENZIAMENTO DNA FITOPLASMALE	n.e.
RFLP VIRTUALI	n.e.
GENE TENGU	n.e.
ISOLAMENTO BATTERICO	Si → <i>R. fascians</i> (-)
PCR DNA BATTERICO	n.e.
SEQUENZIAMENTO DNA BATTERICO	n.e.

NOTE BIBLIOGRAFICHE	Penzig O., 1894, 1922; Ottonello D., 1986; Spadaro <i>et al.</i> , 2010.
---------------------	--

#### DOCUMENTAZIONE FOTOGRAFICA



SCHEDA NUMERO: 32	
TERATOLOGIA/SINDROME	Evidente fasciazione settoriale dei rami, con ripiegamento e necrosi.
SPECIE	<i>Spartium junceum</i> L.
FAMIGLIA	Fabaceae
NOTE COROLOGICHE	Specie Eurimediterranea
FORMA BIOLOGICA	Fanerofita cespitosa / arbusto perenne
FASE FENOLOGICA	Post-fruttificazione
DATI SULLA FREQUENZA DEL CASO REPERTATO	1
DATI STAZIONALI	Salina (isola) (ME)
PERIODO DI RINVENIMENTO	Agosto 2010
PROTOCOLLO DI ESTRAZIONE DI ACIDI NUCLEICI TOTALI	Marzachi <i>et al.</i> , 1999
PCR + NESTED PCR	P1/16S-SR (n.v.) → R16F2n/R2 (+) P1/16S-SR (n.v.) → fU5/rU3 (+)
CLONAGGIO IN <i>ESCHERICHIA COLI</i>	Si
SEQUENZIAMENTO DNA FITOPLASMALE	Si (GenBank acc. N. JQ181552)
RFLP VIRTUALI	16SrX-D
GENE TENGU	n.e.
ISOLAMENTO BATTERICO	n.e.
PCR DNA BATTERICO	n.e.
SEQUENZIAMENTO DNA BATTERICO	n.e.

NOTE BIBLIOGRAFICHE	Penzig O., 1894, 1922; Ottonello D. e Raimondo F.M., 1984; Marcone <i>et al.</i> , 1996, 2004; Cristaudo <i>et al.</i> , 2010.
---------------------	--

#### DOCUMENTAZIONE FOTOGRAFICA



SCHEDA NUMERO: 33	
TERATOLOGIA/SINDROME	Scopazzi settoriali che si evolvono in fasciazioni gravi e crestature; aumento della tomentosità; necrosi della terminazione dei fasci vascolari; fillomania. I rami fasciati necrotizzano totalmente disseccandosi anticipatamente rispetto al resto della vegetazione asintomatica.
SPECIE	<i>Spartium junceum</i> L.
FAMIGLIA	Fabaceae
NOTE COROLOGICHE	Specie Eurimediterranea
FORMA BIOLOGICA	Fanerofita cespitosa / arbusto perenne
FASE FENOLOGICA	Diverse fasi fenologiche
DATI SULLA FREQUENZA DEL CASO REPERTATO	3
DATI STAZIONALI	Monte Serra, Viagrande (CT)
PERIODO DI RINVENIMENTO	Dal 2010 al 2011
PROTOCOLLO DI ESTRAZIONE DI ACIDI NUCLEICI TOTALI	Marzachi <i>et al.</i> , 1999
PCR + NESTED PCR	P1/16S-SR (n.v.) → R16F2n/R2 (+) P1/16S-SR (n.v.) → fU5/rU3 (+)
CLONAGGIO IN <i>ESCHERICHIA COLI</i>	Si
SEQUENZIAMENTO DNA FITOPLASMALE	Si (GenBank acc. N. JQ181554)
RFLP VIRTUALI	16SrV-C
GENE TENGU	n.e.
ISOLAMENTO BATTERICO	Si → <i>R. fascians</i> (-)
PCR DNA BATTERICO	n.e.
SEQUENZIAMENTO DNA BATTERICO	n.e.

NOTE BIBLIOGRAFICHE	Penzig O., 1894, 1922; Ottonello D. e Raimondo F.M., 1984;. Marcone <i>et al.</i> , 1996, 2004; Cristaudo <i>et al.</i> , 2010.
---------------------	---

#### DOCUMENTAZIONE FOTOGRAFICA



SCHEDA NUMERO: 34	
TERATOLOGIA/SINDROME	Scopazzi settoriale con fasciazioni lineari e crestature; aumento della tomentosità e fillomania.
SPECIE	<i>Spartium junceum</i> L.
FAMIGLIA	Fabaceae
NOTE COROLOGICHE	Specie Eurimediterranea
FORMA BIOLOGICA	Fanerofita cespitosa / arbusto perenne
FASE FENOLOGICA	Prefioritura
DATI SULLA FREQUENZA DEL CASO REPERTATO	2
DATI STAZIONALI	Castelbuono, (PA)
PERIODO DI RINVENIMENTO	Marzo 2010
PROTOCOLLO DI ESTRAZIONE DI ACIDI NUCLEICI TOTALI	Marzachi <i>et al.</i> , 1999
PCR + NESTED PCR	P1/16S-SR (n.v.) → R16F2n/R2 (+) P1/16S-SR (n.v.) → fU5/rU3 (+)
CLONAGGIO IN <i>ESCHERICHIA COLI</i>	n.e.
SEQUENZIAMENTO DNA FITOPLASMALE	Si (GenBank acc. N. JQ181553)
RFLP VIRTUALI	16SrX-D
GENE TENGU	n.e.
ISOLAMENTO BATTERICO	n.e.
PCR DNA BATTERICO	n.e.
SEQUENZIAMENTO DNA BATTERICO	n.e.

NOTE BIBLIOGRAFICHE	Penzig O., 1894, 1922; Ottonello D. e Raimondo F.M., 1984; Marcone <i>et al.</i> , 1996, 2004; Cristaudo <i>et al.</i> , 2010.
---------------------	--

#### DOCUMENTAZIONE FOTOGRAFICA



SCHEDA NUMERO: 35	
TERATOLOGIA/SINDROME	Accestimento per evidente accorciamento degli internodi e fasciazione settoriale; fiori sterili (non si osservano stami e pistilli).
SPECIE	<i>Rumex bucephalophorus</i> L. subsp. <i>bucephalophorus</i>
FAMIGLIA	Polygonaceae
NOTE COROLOGICHE	Specie Mediterranea-Macaronesica
FORMA BIOLOGICA	Terofita scaposa / erbacea annuale
FASE FENOLOGICA	Fioritura
DATI SULLA FREQUENZA DEL CASO REPERTATO	3
DATI STAZIONALI	Monte S. Nicolò, Trecastagni (CT)
PERIODO DI RINVENIMENTO	Dal 2010 al 2011
PROTOCOLLO DI ESTRAZIONE DI ACIDI NUCLEICI TOTALI	Marzachi <i>et al.</i> , 1999
PCR + NESTED PCR	P1/16S-SR (n.v.) → R16F2n/R2 (+) P1/16S-SR (n.v.) → fU5/rU3 (+)
CLONAGGIO IN <i>ESCHERICHIA COLI</i>	Si
SEQUENZIAMENTO DNA FITOPLASMALE	Si (GenBank acc. N. JQ181548; JQ181551)
RFLP VIRTUALI	16SrI-B
GENE TENGU	Tengu f/r (+)
ISOLAMENTO BATTERICO	n.e.
PCR DNA BATTERICO	n.e.
SEQUENZIAMENTO DNA BATTERICO	n.e.
NOTE BIBLIOGRAFICHE	Penzig O., 1922; Cristaudo <i>et al.</i> , 2010.

#### DOCUMENTAZIONE FOTOGRAFICA



SCHEDA NUMERO: 36	
TERATOLOGIA/SINDROME	Accestimento grave; le piante assumono un habitus a cuscinetto; fiori sterili.
SPECIE	<i>Rumex bucephalophorus</i> L. subsp. <i>Bucephalophorus</i>
FAMIGLIA	Polygonaceae
NOTE COROLOGICHE	Specie Mediterranea-Macaronesica
FORMA BIOLOGICA	Terofita scaposa / erbacea annuale
FASE FENOLOGICA	Fioritura
DATI SULLA FREQUENZA DEL CASO REPERTATO	2
DATI STAZIONALI	Laviniaio, Monterosso (CT)
PERIODO DI RINVENIMENTO	Dal 2010 al 2011
PROTOCOLLO DI ESTRAZIONE DI ACIDI NUCLEICI TOTALI	Marzachi <i>et al.</i> , 1999
PCR + NESTED PCR	P1/16S-SR (n.v.) → R16F2n/R2 (+) P1/16S-SR (n.v.) → fU5/rU3 (+)
CLONAGGIO IN <i>ESCHERICHIA COLI</i>	Si
SEQUENZIAMENTO DNA FITOPLASMALE	Si (GenBank acc. N. JQ181547; JQ181549)
RFLP VIRTUALI	16SrI-B
GENE TENGU	Tengu f/r (+)
ISOLAMENTO BATTERICO	n.e.
PCR DNA BATTERICO	n.e.
SEQUENZIAMENTO DNA BATTERICO	n.e.

NOTE BIBLIOGRAFICHE	Penzig O., 1922; Cristaudo <i>et al.</i> , 2010.
---------------------	--

#### DOCUMENTAZIONE FOTOGRAFICA



SCHEDA NUMERO: 37	
TERATOLOGIA/SINDROME	Evidente accorciamento degli internodi e blastomania. Sono presenti abbozzi fiorali.
SPECIE	<i>Rumex bucephalophorus</i> L. subsp. <i>bucephalophorus</i>
FAMIGLIA	Polygonaceae
NOTE COROLOGICHE	Specie Mediterranea-Macaronesica
FORMA BIOLOGICA	Terofita scaposa / erbacea annuale
FASE FENOLOGICA	Fioritura
DATI SULLA FREQUENZA DEL CASO REPERTATO	2
DATI STAZIONALI	Poggio Arena, Manfredonia (CL)
PERIODO DI RINVENIMENTO	Marzo 2011
PROTOCOLLO DI ESTRAZIONE DI ACIDI NUCLEICI TOTALI	Marzachi <i>et al.</i> , 1999
PCR + NESTED PCR	P1/16S-SR (n.v.) → R16F2n/R2 (+) P1/16S-SR (n.v.) → fU5/rU3 (+)
CLONAGGIO IN <i>ESCHERICHIA COLI</i>	Si
SEQUENZIAMENTO DNA FITOPLASMALE	Si (GenBank acc. N. JQ181550)
RFLP VIRTUALI	16SrI-P
GENE TENGU	Tengu f/r (+)
ISOLAMENTO BATTERICO	n.e.
PCR DNA BATTERICO	n.e.
SEQUENZIAMENTO DNA BATTERICO	n.e.

NOTE BIBLIOGRAFICHE	Penzig O., 1922; Cristaudo <i>et al.</i> , 2010.
---------------------	--

#### DOCUMENTAZIONE FOTOGRAFICA



SCHEDA NUMERO: 38	
TERATOLOGIA/SINDROME	Evidente fasciazione settoriale accompagnata da proliferazione degli abbozzi fiorali.
SPECIE	<i>Euphorbia characias</i> L.
FAMIGLIA	Euphorbiaceae
NOTE COROLOGICHE	Specie Steno-Mediterranea
FORMA BIOLOGICA	Nano-fanerofita / legnosa perenne
FASE FENOLOGICA	Fioritura
DATI SULLA FREQUENZA DEL CASO REPERTATO	0
DATI STAZIONALI	Località Sciarelle, Trecastagni (CT)
PERIODO DI RINVENIMENTO	Marzo 2011
PROTOCOLLO DI ESTRAZIONE DI ACIDI NUCLEICI TOTALI	Marzachi <i>et al.</i> , 1999
PCR + NESTED PCR	P1/16S-SR (n.v.) → R16F2n/R2(-) P1/16S-SR (n.v.) → fU5/rU3(+) P1/16S-SR (n.v.) → BGWL4f/r (+)
CLONAGGIO IN <i>ESCHERICHIA COLI</i>	n.e.
SEQUENZIAMENTO DNA FITOPLASMALE	n.e.
RFLP VIRTUALI	n.e.
GENE TENGU	n.e.
ISOLAMENTO BATTERICO	Si → <i>R. fascians</i> (-)
PCR DNA BATTERICO	n.e.
SEQUENZIAMENTO DNA BATTERICO	n.e.

NOTE BIBLIOGRAFICHE	Penzig O., 1894, 1922; Spallino <i>et al.</i> , 2011a.
---------------------	--

#### DOCUMENTAZIONE FOTOGRAFICA



SCHEDA NUMERO: 39	
TERATOLOGIA/SINDROME	Evidente fasciazione dello scapo florale. La pianta mostra la sindrome da almeno 25 anni.
SPECIE	<i>Sophora secundiflora</i> (Gomez-Ortega) Lag. ex DC.
FAMIGLIA	Fabaceae
NOTE COROLOGICHE	Specie originaria del Texas e del Messico
FORMA BIOLOGICA	Fanerofita scaposa / albero
FASE FENOLOGICA	Fioritura
DATI SULLA FREQUENZA DEL CASO REPERTATO	0
DATI STAZIONALI	Giardino Garibaldi, Palermo
PERIODO DI RINVENIMENTO	Marzo 2011
PROTOCOLLO DI ESTRAZIONE DI ACIDI NUCLEICI TOTALI	Marzachi <i>et al.</i> , 1999
PCR + NESTED PCR	P1/16S-SR (n.v.) → R16F2n/R2(-) P1/16S-SR (n.v.) → fU5/rU3(-)
CLONAGGIO IN <i>ESCHERICHIA COLI</i>	n.e.
SEQUENZIAMENTO DNA FITOPLASMALE	n.e.
RFLP VIRTUALI	n.e.
GENE TENGU	n.e.
ISOLAMENTO BATTERICO	Si → <i>R. fascians</i> (-)
PCR DNA BATTERICO	530f/1492r (+) JRERIGHT/JRELEFT (-)
SEQUENZIAMENTO DNA BATTERICO	Si [GenBank acc. N. GU980233.1 = <i>Sphingomonas</i> sp. (99%)]

NOTE BIBLIOGRAFICHE	Ottonello D., 1986.
---------------------	---------------------

#### DOCUMENTAZIONE FOTOGRAFICA



SCHEDA NUMERO: 40	
TERATOLOGIA/SINDROME	Fasciazione del fusto; racemo fiorale allungato con proliferazione gemme fiorali; fiori sviluppati.
SPECIE	<i>Brassica rapa</i> L.
FAMIGLIA	Brassicaceae
NOTE COROLOGICHE	Specie Mediterranea
FORMA BIOLOGICA	Terofita scaposa / emicriptofita scaposa / erbacea annuale, perenne
FASE FENOLOGICA	Fioritura
DATI SULLA FREQUENZA DEL CASO REPERTATO	0
DATI STAZIONALI	C.da Reitana (Primosole), Azienda agraria sperimentale dell'Università di Catania
PERIODO DI RINVENIMENTO	Marzo 2011
PROTOCOLLO DI ESTRAZIONE DI ACIDI NUCLEICI TOTALI	Marzachi <i>et al.</i> , 1999
PCR + NESTED PCR	P1/16S-SR (n.v.) → R16F2n/R2(-) P1/16S-SR (n.v.) → fU5/rU3(-)
CLONAGGIO IN <i>ESCHERICHIA COLI</i>	n.e.
SEQUENZIAMENTO DNA FITOPLASMALE	n.e.
RFLP VIRTUALI	n.e.
GENE TENGU	n.e.
ISOLAMENTO BATTERICO	Si → <i>R. fascians</i> (-)
PCR DNA BATTERICO	n.e.
SEQUENZIAMENTO DNA BATTERICO	n.e.

NOTE BIBLIOGRAFICHE	Otonello D. e Raimondo F.M., 1984; Spallino <i>et al.</i> , 2011a.
---------------------	--

#### DOCUMENTAZIONE FOTOGRAFICA



SCHEDA NUMERO: 41	
TERATOLOGIA/SINDROME	Scopazzi settoriali accompagnati da evidenti fasciazioni.
SPECIE	<i>Spartium junceum</i> L.
FAMIGLIA	Fabaceae
NOTE COROLOGICHE	Specie Eurimediterranea
FORMA BIOLOGICA	Fanerofita cespitosa / arbusto perenne
FASE FENOLOGICA	Pre-fioritura
DATI SULLA FREQUENZA DEL CASO REPERTATO	0
DATI STAZIONALI	Presso l'aeroporto Falcone Borsellino, Palermo
PERIODO DI RINVENIMENTO	Marzo 2011
PROTOCOLLO DI ESTRAZIONE DI ACIDI NUCLEICI TOTALI	Marzachi <i>et al.</i> , 1999
PCR + NESTED PCR	P1/16S-SR (n.v.) → R16F2n/R2(-) P1/16S-SR (n.v.) → fU5/rU3(-)
CLONAGGIO IN <i>ESCHERICHIA COLI</i>	n.e.
SEQUENZIAMENTO DNA FITOPLASMALE	n.e.
RFLP VIRTUALI	n.e.
GENE TENGU	n.e.
ISOLAMENTO BATTERICO	n.e.
PCR DNA BATTERICO	n.e.
SEQUENZIAMENTO DNA BATTERICO	n.e.

NOTE BIBLIOGRAFICHE	Penzig O., 1894, 1922; Ottonello D. e Raimondo F.M., 1984; Marcone <i>et al.</i> , 1996, 2004; Cristaudo <i>et al.</i> , 2010.
---------------------	--

#### DOCUMENTAZIONE FOTOGRAFICA



SCHEDA NUMERO: 42	
TERATOLOGIA/SINDROME	Evidente accorciamento degli internodi accompagnato da ingiallimento.
SPECIE	<i>Picris echioides</i> L.
FAMIGLIA	Asteraceae
NOTE COROLOGICHE	Specie Eurosiberiana
FORMA BIOLOGICA	Emicriptofita scaposa / erbacea bienne
FASE FENOLOGICA	Fioritura
DATI SULLA FREQUENZA DEL CASO REPERTATO	0
DATI STAZIONALI	C.da S. Nicola, Caltagirone (CT)
PERIODO DI RINVENIMENTO	Luglio 2011
PROTOCOLLO DI ESTRAZIONE DI ACIDI NUCLEICI TOTALI	Marzachi <i>et al.</i> , 1999
PCR + NESTED PCR	P1/16S-SR (n.v.) → R16F2n/R2 (+) P1/16S-SR (n.v.) → fU5/rU3 (+)
CLONAGGIO IN <i>ESCHERICHIA COLI</i>	Si
SEQUENZIAMENTO DNA FITOPLASMALE	Si (GenBank acc. N. JQ181546)
RFLP VIRTUALI	16SrIX-C
GENE TENGU	n.e.
ISOLAMENTO BATTERICO	n.e.
PCR DNA BATTERICO	n.e.
SEQUENZIAMENTO DNA BATTERICO	n.e.

NOTE BIBLIOGRAFICHE	Penzig O., 1894, 1922.
---------------------	------------------------

#### DOCUMENTAZIONE FOTOGRAFICA



SCHEDA NUMERO: 43	
TERATOLOGIA/SINDROME	Proliferazione cladodi modificati, assenza di fiori, frutti e spine.
SPECIE	<i>Opuntia ficus-indica</i> (L.) Mill.
FAMIGLIA	Cactaceae
NOTE COROLOGICHE	Specie esotica di origine messicana, risulta ampiamente spontaneizzata nella regione mediterranea
FORMA BIOLOGICA	Fanerofita succulenta / succulenta perenne
FASE FENOLOGICA	Vegetativa
DATI SULLA FREQUENZA DEL CASO REPERTATO	0 (Piante in collezione)
DATI STAZIONALI	DISPA, Sez. Fitopatologia e Genetica vegetale dell'Università di Catania
PERIODO DI RINVENIMENTO	Luglio 2011
PROTOCOLLO DI ESTRAZIONE DI ACIDI NUCLEICI TOTALI	Cai <i>et al.</i> , 2001
PCR + NESTED PCR	P1/16S-SR (n.v.) → R16F2n/R2 (+) P1/16S-SR (n.v.) → fU5/rU3 (+)
CLONAGGIO IN <i>ESCHERICHIA COLI</i>	Si
SEQUENZIAMENTO DNA FITOPLASMALE	Si (GenBank acc. N. JQ181545)
RFLP VIRTUALI	16SrII-I
GENE TENGU	n.e.
ISOLAMENTO BATTERICO	n.e.
PCR DNA BATTERICO	n.e.
SEQUENZIAMENTO DNA BATTERICO	n.e.

NOTE BIBLIOGRAFICHE	Penzig O., 1894, 1922; Tessitori <i>et al.</i> , 2006; Cai <i>et al.</i> , 2008; Cristaudo <i>et al.</i> , 2010; Spallino <i>et al.</i> , 2011a, 2011b.
---------------------	---

#### DOCUMENTAZIONE FOTOGRAFICA



SCHEDA NUMERO: 44	
TERATOLOGIA/SINDROME	“Forma mostruosa”. Proliferazione fusto e gemme.
SPECIE	<i>Austocylindropuntia exaltata</i> (A. Berger) Backeb. “monstruosa”
FAMIGLIA	Cactaceae
NOTE COROLOGICHE	Specie originaria del Sud America (Perù, Cile)
FORMA BIOLOGICA	Camefita succulenta / succulenta perenne
FASE FENOLOGICA	Vetegativa
DATI SULLA FREQUENZA DEL CASO REPERTATO	0
DATI STAZIONALI	n.r.
PERIODO DI RINVENIMENTO	Luglio 2011
PROTOCOLLO DI ESTRAZIONE DI ACIDI NUCLEICI TOTALI	Cai <i>et al.</i> , 2001
PCR + NESTED PCR	P1/16S-SR (n.v.) → R16F2n/R2 (+) P1/16S-SR (n.v.) → fU5/rU3 (+)
CLONAGGIO IN <i>ESCHERICHIA COLI</i>	Si
SEQUENZIAMENTO DNA FITOPLASMALE	Si (GenBank acc. N. JQ181544)
RFLP VIRTUALI	16SrII
GENE TENGU	n.e.
ISOLAMENTO BATTERICO	n.e.
PCR DNA BATTERICO	n.e.
SEQUENZIAMENTO DNA BATTERICO	n.e.

NOTE BIBLIOGRAFICHE	Spallino <i>et al.</i> , 2011b.
---------------------	---------------------------------

#### DOCUMENTAZIONE FOTOGRAFICA



SCHEDA NUMERO: 45	
TERATOLOGIA/SINDROME	Crestatatura
SPECIE	<i>Opuntia cylindrica</i> (Lam.) DC. "monstruosa
FAMIGLIA	Cactaceae
NOTE COROLOGICHE	Specie originaria del Sud America (Perù, Ecuador)
FORMA BIOLOGICA	Camefita succulenta / succulenta perenne
FASE FENOLOGICA	Vegetativa
DATI SULLA FREQUENZA DEL CASO REPERTATO	0
DATI STAZIONALI	n.r.
PERIODO DI RINVENIMENTO	Luglio 2011
PROTOCOLLO DI ESTRAZIONE DI ACIDI NUCLEICI TOTALI	Cai <i>et al.</i> , 2001
PCR + NESTED PCR	P1/16S-SR (n.v.) → R16F2n/R2(-) P1/16S-SR (n.v.) → fU5/rU3(-)
CLONAGGIO IN <i>ESCHERICHIA COLI</i>	n.e.
SEQUENZIAMENTO DNA FITOPLASMALE	n.e.
RFLP VIRTUALI	n.e.
GENE TENGU	n.e.
ISOLAMENTO BATTERICO	n.e.
PCR DNA BATTERICO	n.e.
SEQUENZIAMENTO DNA BATTERICO	n.e.

NOTE BIBLIOGRAFICHE	Spallino <i>et al.</i> , 2011b.
---------------------	---------------------------------

#### DOCUMENTAZIONE FOTOGRAFICA



SCHEDA NUMERO: 46	
TERATOLOGIA/SINDROME	Proliferaazione cladodi e gemme. Diminuzione numero spine
SPECIE	<i>Opuntia subulata</i> Engelm. "monstruosa"
FAMIGLIA	Cactaceae
NOTE COROLOGICHE	specie originaria del Sud America (Perù, Cile)
FORMA BIOLOGICA	camefita succulenta / succulenta perenne
FASE FENOLOGICA	Vegetativa
DATI SULLA FREQUENZA DEL CASO REPERTATO	0
DATI STAZIONALI	n.r.
PERIODO DI RINVENIMENTO	Luglio 2011
PROTOCOLLO DI ESTRAZIONE DI ACIDI NUCLEICI TOTALI	Cai <i>et al.</i> , 2001
PCR + NESTED PCR	P1/16S-SR (n.v.) → R16F2n/R2 (+) P1/P7 (n.v.) → fU5/rU3 (+)
CLONAGGIO IN <i>ESCHERICHIA COLI</i>	Si
SEQUENZIAMENTO DNA FITOPLASMALE	Si (GenBank acc. N. JQ181543)
RFLP VIRTUALI	16SrII
GENE TENGU	n.e.
ISOLAMENTO BATTERICO	n.e.
PCR DNA BATTERICO	n.e.
SEQUENZIAMENTO DNA BATTERICO	n.e.

NOTE BIBLIOGRAFICHE	Spallino <i>et al.</i> , 2011b.
---------------------	---------------------------------

#### DOCUMENTAZIONE FOTOGRAFICA



SCHEDA NUMERO: 47	
TERATOLOGIA/SINDROME	Sintomi settoriali di ingiallimento ed accartoccamento fogliare (foglia a triangolo).
SPECIE	<i>Vitis vinifera</i> L. cv. <i>Chardonnay</i>
FAMIGLIA	Vitaceae
NOTE COROLOGICHE	Cultivar di origine orticola
FORMA BIOLOGICA	Fanerofita / cespuglio
FASE FENOLOGICA	Fruttificazione
DATI SULLA FREQUENZA DEL CASO REPERTATO	1
DATI STAZIONALI	Chiaromonte Gulfi (RG)
PERIODO DI RINVENIMENTO	Luglio 2009
PROTOCOLLO DI ESTRAZIONE DI ACIDI NUCLEICI TOTALI	Marzachi <i>et al.</i> , 1999
PCR + NESTED PCR	P1/16S-SR (n.v.) → R16F2n/R2 (+) P1/P7 (n.v.) → fU5/rU3 (+) P1/P7 (n.v.) → R16(I)F1/R1 (+)
CLONAGGIO IN <i>ESCHERICHIA COLI</i>	si
SEQUENZIAMENTO DNA FITOPLASMALE	Si (GenBank acc. N. JQ181555)
RFLP VIRTUALI	16SrXII
GENE TENGU	n.e.
ISOLAMENTO BATTERICO	n.e.
PCR DNA BATTERICO	n.e.
SEQUENZIAMENTO DNA BATTERICO	n.e.

NOTE BIBLIOGRAFICHE	Penzig O., 1894, 1922; Ottonello D., 1986; Martelli G.P., 2002; Tessitori <i>et al.</i> , 2007.
---------------------	---

#### DOCUMENTAZIONE FOTOGRAFICA



## **ALLEGATO II**

### **ALLINEAMENTI**



Program: needle  
# 1: Brassica JQ181539  
# 2: M30790  
# Score: 6148.0

```
          10      20      30      40
Brassi  ACGACTGCTAAGACTGGATAGGAGACAAGAAGGCATCTTCTGTGTTTTTA
M30790  .....

          50      60      70      80      90
Brassi  AAAGACCTAGCAATAGGTATGCTTAGGGAGGAGCTTCCGTCACATTAGTT
M30790  .....

         100     110     120     130     140
Brassi  AGTTGGTGGGGTAAAGGCCACCAAGACTATGATGTGTAGCCGGGTGAG
M30790  .....

         150     160     170     180     190
Brassi  AGGTTGAACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGA
M30790  .....

         200     210     220     230     240
Brassi  GGCAGCAGTAGGGAATTTTCGGCAATGGAGGAAACTCTGACCAGCAACG
M30790  .....

         250     260     270     280     290
Brassi  CCGCGTGAACGATGAAGTATTTTCGGTACGTAAAGTTCTTTTATTAGGAA
M30790  .....

         300     310     320     330     340
Brassi  -GAATAAATGATGGAAAAATCATT-CTGACGGTACCTAATGAATAAGCCC
M30790  G.....G.....

         350     360     370     380     390
Brassi  CGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGGGGGCAAGCGTTA
M30790  .....

         400     410     420     430     440
Brassi  TCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCCTAGGCGGTTAAATAAGTTTATG
M30790  .....

         450     460     470     480     490
Brassi  GTCTAAGTGCAATGCTCAACATTGTGATGCTATAAAAACTGTTTAGCTAG
M30790  .....

         500     510     520     530     540
Brassi  AGTAAGATAGAGGCAAGTGGAATCCATGTGTAGTGGTAAAAATGCGTAAA
M30790  .....C.....

         550     560     570     580     590
Brassi  TATATGGAGGAACACCAGTAGCGAAGGCGGCTTGTGGGTCTTTACTGAC
M30790  .....
```

```
          600     610     620     630     640
Brassi  GCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGT
M30790  .....

          650     660     670     680     690
Brassi  CCACGCCGTAAACGATGAGTACTAAACGTTGGGTAAAACAGTGTGAAG
M30790  .....

          700     710     720     730     740
Brassi  TTAACACATTAAGTACTCCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACT
M30790  .....

          750     760     770     780     790
Brassi  TAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTTAATT
M30790  .....

          800     810     820     830     840
Brassi  CGAAGGTACCCGAAAAACCTCACCAGGTCTTGACATGCTTCTGCAAAGCT
M30790  .....

          850     860     870     880     890
Brassi  GTAGAAACACAGTGGAGTTATCAGTTGCACAGGTGGTGCATGGTTGTCG
M30790  .....

          900     910     920     930     940
Brassi  TCAGCTCGTGTGATGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCC
M30790  .....

          950     960     970     980     990
Brassi  TTTATTGTTAGTTACCAGCACGTAATGGTGGGACTTTAGCAAGACTGCC
M30790  -.....

         1000    1010    1020    1030    1040
Brassi  AGTGATAAAATGGAGGAAGTGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCCTT
M30790  .....

         1050    1060    1070    1080    1090
Brassi  ATGACCTGGGCTACAAACGTGATACAATGGCTGTTACAAAGGGTAGCTGA
M30790  .....

         1100    1110    1120    1130    1140
Brassi  AGCGCAAGTTTTTGGCGAATCTCAAAAAACAGTCTCAGTTCGGATTGAA
M30790  .....

         1150    1160    1170    1180    1190
Brassi  GTCTGCAACTCGACTTCATGAAGTTAGAATCGCTAGTAATCGCGAAT-CA
M30790  .....G.....C..

         1200    1210    1220    1230    1240
Brassi  GCATGTCGCGGTGAATACGTTTCGCGGGGTTTGTACACACCGCCCGTCA--
M30790  .....T.....AA
```

# Program: needle  
# 1: Bois JQ181540  
# 2: AF248959  
# Score: 6133.0

```
      10      20      30      40      50
Bois CTGCTAAGACTGGATAGGAGATAAGAAGGCATCTTCTTATTTTTAAAGA
AF2489 .....T.....

      60      70      80      90     100
Bois CCAAGCAATAGGTATGCTTAGGGAAGAGCTTGCGTACATTAGTTAGTTG
AF2489 ..T.....

      110     120     130     140     150
Bois GTGGGGTAATGGCCTACCAAGACGATGATGTGTAGCCGGCTGAGAGGTC
AF2489 .....

      160     170     180     190     200
Bois GAACGGCCACATTTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAG
AF2489 .....

      210     220     230     240     250
Bois CAGTAAGGAATTTTCGGCAATGGAGGAAACTCTGACCGAGCAATGCCCGC
AF2489 .....

      260     270     280     290     300
Bois TGAACGATGAAGTATTTTCGGTACGTAAGTCTTTTATTAGGGAAGAAAG
AF2489 .....A

      310     320     330     340     350
Bois GATGGTGGAAAAACCATTATGACGGTACCTAATGAATAAGCCCGGCTAA
AF2489 .....

      360     370     380     390     400
Bois CTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGGGGGCAAGCGTTATCCGGAA
AF2489 .....

      410     420     430     440     450
Bois TTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTTAAATAAGTTTATGGTCTAAG
AF2489 .....

      460     470     480     490     500
Bois TGCAACGCTCAACGTTGTGATGCTATAAAAACGTGTTTAGCTAGAGTTGGA
AF2489 .....T.....

      510     520     530     540     550
Bois TAGAGGCAAGTGGAAATCCCGTGTGTAGTGGTAAAAATGCGTAAATATACGG
AF2489 .....

      560     570     580     590     600
Bois AGGAACACCAGAAGCGAAGCGGCTTGCTGGGTCTTAACCTGACGCTGAGG
AF2489 .....A.....
```

```
      610     620     630     640     650
Bois CACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCC
AF2489 .....

      660     670     680     690     700
Bois CTA AACGATGAGTACTAAACGTTGGATAAAACCAGTGTGAAGTTAACAC
AF2489 .....

      710     720     730     740     750
Bois ATTAGGTACTCCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAACTTAAAGGA
AF2489 ....A.....

      760     770     780     790     800
Bois ATTGACGGGACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTTAAATTCGAAGGT
AF2489 .....

      810     820     830     840     850
Bois ACCCGAAAAACCTCACCAGGCTTGACATGCTTTTGCAAAGCTGTAGAAA
AF2489 .....

      860     870     880     890     900
Bois TACAGTGAGGTTATCAGAAGCACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTACGCTC
AF2489 .....C.....

      910     920     930     940     950
Bois GTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTGT
AF2489 .....

      960     970     980     990    1000
Bois TAATTGCCATCATTAAGTTGGGGACTTTAGCAAGACTGCCAATGATAAAT
AF2489 .....

      1010    1020    1030    1040    1050
Bois TGGAGGAAGGTGGGGACGACGCTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGG
AF2489 .....

      1060    1070    1080    1090    1100
Bois CTACAAACGTGATACAATGGCTGTTACAAAGGGTAGCTAAAGCGTAAGCT
AF2489 .....T.....

      1110    1120    1130    1140    1150
Bois TCTGGCGAATCTCAAAAAGCAGTCTCAGTTCGGATTGAAGTCTGCAACT
AF2489 .....

      1160    1170    1180    1190    1200
Bois CGACTTCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTCGCGG
AF2489 .....

      1210    1220    1230    1240
Bois TGAATACGTTCTCGGGGTTTGTACACACCGCCCGTCA-----
AF2489 .....AACCACGAAAGTT
```

# Program: needle  
# 1: Fedia JQ181541  
# 2: M30790  
# Score: 6140.0

```
          10          20          30          40
Fedia  ACGACTGCTAAGACTGGATAGGAGACAAGAAGGCATCTTCTGTGTTTTTA
M30790  .....

          50          60          70          80          90
Fedia  AAAGACCTAGCAATAGGTATGCTTAGGGAGGAGCTTCGCTCACATTAGTT
M30790  .....

         100         110         120         130         140
Fedia  AGTTGGTGGGGTAAAGGCCACCAAGACTATGATGTGTAGCCGGGTGAG
M30790  .....

         150         160         170         180         190
Fedia  AGGTTGAACGGCCACATTTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGA
M30790  .....

         200         210         220         230         240
Fedia  GGCAGCAGTAGGGAATTTTCGGCAATGGAGGAAACTCTGACCCGAGCAACG
M30790  .....

         250         260         270         280         290
Fedia  CCGCGTGAACGATGAAGTATTTTCGGTACGTAAAGTTCTTTTATTAGGAA
M30790  .....

         300         310         320         330         340
Fedia  -GAATAAATGATGGAAAAATCATT-CTGACGGTACCTAATGAATAAGCCC
M30790  G.....G.....

         350         360         370         380         390
Fedia  CGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGGGGGCAAGCGTTA
M30790  .....

         400         410         420         430         440
Fedia  TCTGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCCTAGCCGTTAAATAAGTTTATG
M30790  ..C.....

         450         460         470         480         490
Fedia  GTCTAAGTGAATGCTCAACATTGTGATGCTATAAAAACTGTTTAGCTAG
M30790  .....

         500         510         520         530         540
Fedia  AGTAAGATAGAGGCAAGTGGAAATCCATGTGTAGTGGTAAAAATGCGTAAA
M30790  .....C.....

         550         560         570         580         590
Fedia  TATATGGAGGAACACCAGTAGCGAAGGCGGCTTGCTGGGTCTTTACTGAC
M30790  .....
```

```
          600          610          620          630          640
Fedia  GCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGT
M30790  .....

          650          660          670          680          690
Fedia  CCACGCCGTAAACGATGAGTACTAAACGTTGGGTAAAACAGTGTGAAG
M30790  .....

          700          710          720          730          740
Fedia  TTAACACATTAAGTACTCCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACT
M30790  .....

          750          760          770          780          790
Fedia  TAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTTAATT
M30790  .....

          800          810          820          830          840
Fedia  CGAAGGTACCCGAAAAACCTCACCAGGCTTTGACATGCTTCTGCAAAGCT
M30790  .....

          850          860          870          880          890
Fedia  GTAGAAACACAGTGGAGGTTATCAGTTGCACAGGTGGTGCATGGTTGTCG
M30790  .....

          900          910          920          930          940
Fedia  TCAGCTCGTGTGATGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCC
M30790  .....

          950          960          970          980          990
Fedia  TTATTGTTAGTTACCAGCACGTAATGGTGGGACTTTAGCAAGACTGCCA
M30790  .....

         1000         1010         1020         1030         1040
Fedia  GTGATAAATTGGAGGAAGGTGGGGCGACGTCAAATCATCATGCCCTTA
M30790  .....A.....

         1050         1060         1070         1080         1090
Fedia  TGACCTGGGCTACAAACGTGATACAATGGCTGTTACAAAGGGTAGCTGAA
M30790  .....

         1100         1110         1120         1130         1140
Fedia  GCGCAAGTTTTTGGCGAATCTCAAAAAACAGTCTCAGTTCGGATTGAAG
M30790  .....

         1150         1160         1170         1180         1190
Fedia  TCCGCAACTCGACTTCATGAAGTTGGAATCGTAGTAATCGCGAAT-CAG
M30790  ..T.....C...

         1200         1210         1220         1230         1240
Fedia  CATGTCGCGGTGAATACGTTCCGCGGGTTTGTACACACCCCGCTCA---
M30790  .....T.....AAC
```

# Program: needle  
# 1: Linaria JQ181542  
# 2: M30790  
# Score: 6140.0

```
          10      20      30      40
Linari  ACGACTGCTAAGACTGGATAGGAGACAAGAGGGCATCTTCTGTTTTTA
M30790  .....A.....

          50      60      70      80      90
Linari  AAAGACCTAGCGGTAGGTATGCTTAGGGAGGAGCTTCCGTCACATTAGTT
M30790  .....AA.....

         100     110     120     130     140
Linari  AGTTGGTGGGGTAAAGGCCAACAAGACTATGATGTGTAGCCGGGCTGAG
M30790  .....C.....

         150     160     170     180     190
Linari  AGGTTGAACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGA
M30790  .....

         200     210     220     230     240
Linari  GGCAGCAGTAGGGAATTTTCGGCAATGGAGGAAACTCTGACCAGCAACG
M30790  .....

         250     260     270     280     290
Linari  CCGCGTGAACGATGAAGTATTTTCGGTACGTAAAGTTCTTTTATTAGGAA
M30790  .....

         300     310     320     330     340
Linari  -GAATAAATGATGGAAAAATCATT-CTGACGGTACCTAATGAATAAGCCC
M30790  G.....G.....

         350     360     370     380     390
Linari  CGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGTAATACATAGGGGGCAAGCGTTA
M30790  .....

         400     410     420     430     440
Linari  TCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCCTAGCCGTTAAATAAGTTTATG
M30790  .....

         450     460     470     480     490
Linari  GTCTAAGTGCAATGCTCAACATTGTGATGCTATAAAAACTGTTTAGCTAG
M30790  .....

         500     510     520     530     540
Linari  AGTAAGATAGAGGCAAGTGGAAATCCATGTGTAGTGGTAAAAATGCGTAAA
M30790  .....C.....

         550     560     570     580     590
Linari  TATATGGAGGAACACCAGTAGCGAAGGCGGCTTGTGGGTCTTTACTGAC
M30790  .....
```

```
          600     610     620     630     640
Linari  GCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGT
M30790  .....

          650     660     670     680     690
Linari  CCACGCCGTAAACGATGAGTACTAAACGTTGGGTAAAACAGTGTGAAG
M30790  .....

          700     710     720     730     740
Linari  TTAACACATTAAGTACTCCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACT
M30790  .....

          750     760     770     780     790
Linari  TAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTTAATT
M30790  .....

          800     810     820     830     840
Linari  CGAAGGTACCCGAAAAACCTCACCAGGCTTTGACATGCTTCTGCAAAGCT
M30790  .....

          850     860     870     880     890
Linari  GTAGAAACACAGTGGAGTTATCAGTTGCACAGGTGGTGCATGGTTGTCG
M30790  .....

          900     910     920     930     940
Linari  TCAGCTCGTGTGATGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCC
M30790  .....

          950     960     970     980     990
Linari  TTATTGTTAGTTACCAGCACGTAATGGTGGGACTTTAGCAAGACTGCCA
M30790  .....

         1000    1010    1020    1030    1040
Linari  GTGATAAATGGAGGAAGGTGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCTTA
M30790  .....

         1050    1060    1070    1080    1090
Linari  TGACCTGGGCTACAAACGTGATACAATGGCTGTACAAAGGGTAGCTGAA
M30790  .....

         1100    1110    1120    1130    1140
Linari  GCGCAAGTTTTTGGCGAATCTCAAAAAACAGTCTCAGTTCGGATTGAAG
M30790  .....

         1150    1160    1170    1180    1190
Linari  TCTGCAACTCGACTTCATGAAGTTGGAATCGTAGTAATCGCAAT-CAG
M30790  .....C...

         1200    1210    1220    1230    1240
Linari  CATGTCGCGGTGAATACGTTCTCGGGTTTGTACACACCCGCCGTCA---
M30790  .....AAC
```

Program: needle  
# 1: Opuntiasub JQ181543  
# 2: U15442  
# Score: 6029.5

```
      10      20      30      40      50
ops ACGACTGCTAAGACTGGATAGGAAGAAATAAGGCATCTTATTTCTTTTAA
U15442 ..AGTG.....T.....

      60      70      80      90     100
ops AAGACCTAGTAATAGGTATACTTTAGGAGGGCTTGCGCCATATTAGTTA
U15442 .....G.....

     110     120     130     140     150
ops GTTGGTAGGGCAATGGCCTACCAAGACGATGATGTGTAGCTGGACTGAGA
U15442 .....T.....

     160     170     180     190     200
ops GGTGAAACAGCCACATTTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTGCGGGAG
U15442 .....A.....

     210     220     230     240     250
ops GCAGCAGTAAGGAATTTTCGGCAATGGAGGAAACTCTGACCGAGCAACGC
U15442 .....G.....

     260     270     280     290
ops C-GCGTGAACGACGAAGTACTTTGGTATGTAAAGTTCTTTTATCAAGGAA
U15442 .G.....

     300     310     320     330     340
ops GAAAAGCAAGTGGCGAACCATTTGTTTGGCCGCTACTTGATGAATAAGCCC
U15442 .....T.....

     350     360     370     380     390
ops CGGCTAATTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACATAAGGGGCAAGTGTTA
U15442 .....

     400     410     420     430     440
ops TCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCCTAGGCGGTCTAGTAAGTCAGTG
U15442 .....

     450     460     470     480     490
ops GTGCAATGGCAACGCTCAACGTTGTCCGGCTATTGAAACTGCTAAACTTG
U15442 ...T.....

     500     510     520     530     540
ops AGTTAGATAGAGGCGAGTGAATTCATGTGTAGCGGTAATAATGCGTAAA
U15442 .....

     550     560     570     580     590
ops TATATGGAGGAACACCAGAGGCGTAGGCGGCTCGCTGGGTCTTAACTGAC
U15442 .....
```

```
      600      610      620      630      640
ops GCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGT
U15442 .....

      650      660      670      680      690
ops CCACGCCGTAAACGATGAGTACTAAGTGTCCGGTTAAACCGGTACTGAAG
U15442 .....

      700      710      720      730      740
ops TTAACACATTAAGTACTCCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACT
U15442 .....

      750      760      770      780      790
ops TAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTTAATT
U15442 .....

      800      810      820      830      840
ops CGAAGATACCCGAAAACCTTACCAGGCTTTGACATGTTTTTGCGAACG
U15442 .....

      850      860      870      880      890
ops GTAGTAATATCGTAGAGTTATCAGAAACACAGGTGGTGCATGGTTGTCG
U15442 .....G.....

      900      910      920      930      940
ops TCAGCTCGTGTGATGATGTTAGGTTAAGTCCATAAACGGA-GCGAAACC
U15442 .....G.....

      950      960      970      980      990
ops CTTATCGTTAGTTGCCAGCACGTTATGGTGGGGACTTTAACGAGACTGCC
U15442 .....

     1000     1010     1020     1030     1040
ops AGTGATAAACTGGAGGAAGGTGAGGATCACGTCAAATCAGCATGCCCCCTT
U15442 .....T.....

     1050     1060     1070     1080     1090
ops ATGACCTGGGCTACAAACGTGATACAATGGCTGTTACAAAGGGTAGCTGA
U15442 .....

     1100     1110     1120     1130     1140
ops AACGTAAGTTCTTGGCCAATCCCCAAAACAGTCTCAGTCCGGATTGAAG
U15442 ....C.....

     1150     1160     1170     1180     1190
ops TCTGCAACTCGACTTCATGAAGTTGGGATCGCTAGTAATCGCGAATCAGC
U15442 .....A.....

     1200     1210     1220     1230     1240
ops ATGTCGCGGTGAATACGTTTCGCGGGGTTGTACACACCGCCCGTCA
U15442 .....T.....
```

Program: needle

# 1: Austrocyllindropuntia JQ181544

# 2: U15442

# Score: 6039.5

```
      10      20      30      40
  aus  ATTACTGCTAAGACTGGATAGGAAGAATAAGGCATCTTATTTCTTT
U15442  ..AGTG.....T.....

      50      60      70      80      90
  aus  TAAAGACCTAGTAATAGGTATACTTTAGGAGGGCTTGCCCATATTAG
U15442  .....G.....

     100     110     120     130     140
  aus  TTAGTTGGTAGGGTAATGGCCTACCAAGACGATGATGTGTAGCTGGACTG
U15442  .....

     150     160     170     180     190
  aus  AGAGGTGGAACAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGG
U15442  .....

     200     210     220     230     240
  aus  GAGGCAGCAGTAAGGAATTTTCGGCAATGGAGGAAACTCTGACCGAACAA
U15442  .....G.....

     250     260     270     280     290
  aus  CGCC-GCGTGAACGACGAAGTACTTTGGTATGTAAAGTTCTTTTATCAAG
U15442  ...G.....

     300     310     320     330     340
  aus  GAAGAAAAGCAAGTGGCGAACCATTGTTTGCCTGACTTGATGAATAAG
U15442  .....T.....

     350     360     370     380     390
  aus  CCCCGGCTAATTATGTGCCAGCAGCCGGTAAGACATAAGGGGCAAGTG
U15442  .....

     400     410     420     430     440
  aus  TTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCCTAGGCGGTCTAGTAAGTCA
U15442  .....

     450     460     470     480     490
  aus  GTGGTGTAAATGGCAACGCTCAACGTTGTCCGGCTATTGAACTGCTAAAC
U15442  .....

     500     510     520     530     540
  aus  TTGAGTTAGATAGAGGCGAGTGAATTCATGTGTAGCGGTAAAATGCGT
U15442  .....

     550     560     570     580     590
  aus  AAATATATGGAGGAACACCAGAGGCGTAGGCGGCTCGCTGGGTCTTAACT
U15442  .....

     600     610     620     630     640
  aus  GACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGT
U15442  .....
```

```
      650      660      670      680      690
  aus  AGACCACGCCGTAACCGATGAGTACTAAGTGTCTGGGTTAAACCGGFACTG
U15442  ..T.....

      700      710      720      730      740
  aus  AAGTTAACACATTAAGTACTCCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAA
U15442  .....

      750      760      770      780      790
  aus  ACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTTA
U15442  .....

      800      810      820      830      840
  aus  ATTTCGAAGATACCCGAAAAACCTTACCAGGCTTGACATGCTTTTGCAGAA
U15442  .....T.....

      850      860      870      880      890
  aus  ACGGTAGTAATATCGTAGAGGTTATCAGAAACACAGGTGGTGCATGGTTG
U15442  .....G.....

      900      910      920      930      940
  aus  TCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTAGGTTAAGTCCATAAACGA-GCGAA
U15442  .....G.....

      950      960      970      980      990
  aus  ACCCTTATCGTTAGTTGCCAGCACGTTATGGTGGGGACTTTAACGAGACT
U15442  .....

     1000     1010     1020     1030     1040
  aus  GCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGAGGATCACGTCAAATCAGCATGCC
U15442  .....T.....

     1050     1060     1070     1080     1090
  aus  CTTATGACCTGGGCTACAAACGTGATACAATGGCTGTTACAAAAGGGTAGC
U15442  .....

     1100     1110     1120     1130     1140
  aus  TGAAACGTAAGTTCTTGGCCAATCCCCAAAAACAGTCTCAGTCCGGATTG
U15442  .....C.....

     1150     1160     1170     1180     1190
  aus  AAGTCTGCAACCCGACTTCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATC
U15442  .....T.....

     1200     1210     1220     1230     1240
  aus  AGCATGTCGCGGTGAATACGTTCTCGGGTTTGTACACACCCGCCCTCA
U15442  .....
```

Program: needle  
# 1: Opuntiafic JQ181545  
# 2: U15442  
# Score: 6056.5

```
      10      20      30      40      50
Opf ACGACTGCTAAGACTGGATAGGAAGAAATAAGGCATCTTATTTCTTTTAA
U15442 ..AGTG.....T.....

      60      70      80      90     100
Opf AAGACCTAGTAATAGGTATACTTTAGGAGGGGCTTGCGCCATATTAGTTA
U15442 .....G.....

      110     120     130     140     150
Opf GTTGGTAGGGTAATGGCCTACCAAGACGATGATGTGTAGCTGGACTGAGA
U15442 .....

      160     170     180     190     200
Opf GGTGAAACAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAG
U15442 .....

      210     220     230     240     250
Opf GCAGCAGTAAGGAATTTTCGGCAATGGAGGAAACTCTGACCCGAGCAACGC
U15442 .....G.....

      260     270     280     290
Opf C-GCGTGAACGACGAAGTACTTTGGTATGTAAAGTTCTTTTATCAAGGAA
U15442 .G.....

      300     310     320     330     340
Opf GAAAAGCAAGTGGCGAACCATTGTTTCCCGTACTTGTATGAATAAGCCC
U15442 .....T.....

      350     360     370     380     390
Opf CGGCTAATTATGTGCCAGCAGCCGCGTAAGACATAAGGGGCAAGTGTTA
U15442 .....

      400     410     420     430     440
Opf TCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCCTAGGCGGTCTAGTAAGTCAGTG
U15442 .....

      450     460     470     480     490
Opf GTGTAATGGCAACGCTCAACGTTGTCCGGCTATTGAAACTGCTAAACTTG
U15442 .....

      500     510     520     530     540
Opf AGTTAGATAGAGGCGAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTAATAATGCGTAAA
U15442 .....-.....

      550     560     570     580     590
Opf TATATGGAGGAACACCAGAGGCGTAGGCGGCTCGCTGGGTCTTAAGTGAC
U15442 .....
```

```
      600     610     620     630     640
Opf GCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGT
U15442 .....

      650     660     670     680     690
Opf CCACGCCGTAAACGATGAGTACTAAGTGTCCGGTTAAACCGGTACTGAAG
U15442 .....

      700     710     720     730     740
Opf TTAACACATTAAGTACTCCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACT
U15442 .....

      750     760     770     780     790
Opf TAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTTAATT
U15442 .....-.....

      800     810     820     830     840
Opf CGAAGATACCCGAAAAACCTACC GGCTTTGACATGTTTTTGC GAAACG
U15442 .....A.....

      850     860     870     880     890
Opf GTAGTAATATCGTAGAGTTATCAGAAACACAGGTGGTGCATGGTTGTCG
U15442 .....G.....

      900     910     920     930     940
Opf TCAGCTCGTGTCTGAGATGTTAGGTTAAGTCCATAAACGGA-GCGAAACC
U15442 .....G.....

      950     960     970     980     990
Opf CTTATCGTTAGTTGCCAGCACGTTATGGTGGGGACTTTAACGAGACTGCC
U15442 .....

     1000    1010    1020    1030    1040
Opf AGTGATAAACTGGAGGAAGGTGAGGATCACGTCAAATCAGCATGCCCCTT
U15442 .....T.....

     1050    1060    1070    1080    1090
Opf ATGACCTGGGCTACAAACGTGATACAATGGCTGTTACAAAGGGTAGCTGA
U15442 .....

     1100    1110    1120    1130    1140
Opf AACGTAAGTTCTTGGCCAATCCCCAAAAACAGTCTCAGTCCGGATTGAAG
U15442 ....C.....

     1150    1160    1170    1180    1190
Opf TCTGCAACTCGACTTCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCAATCAGC
U15442 .....

     1200    1210    1220    1230    1240
Opf ATGTCGCGGTGAATACGTTCTCAGGGTTTGTACACACCCGCCCTCA
U15442 .....G.....
```

Program: needle  
# 1: Picris JQ181546  
# 2: AF515636  
# Score: 6109.0

```

                    10      20      30
Picris -----ACGACTGCTAAGACTGGATAGGAAATTAAGAGGCA
AF5156 GGATAACAATTGGAA..AGT.....A.....

                    40      50      60      70      80
Picris TCPTTTAATTTTTAAAAGACCTTTTTCGAAAGGTATGCTTAAAGAGGGGC
AF5156 .....G.....

                    90     100     110     120     130
Picris TTGCGCCACATTAGTTAGTTGGTAAGGTAAGGCTTACCAAGACGATGAT
AF5156 .....

                    140     150     160     170     180
Picris GTGTAGCTGGACTGAGAGGTCGAACAGCCACATTGGGACTGAGACACGGC
AF5156 .....T.....

                    190     200     210     220     230
Picris CCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAATTTTTGGCAATGGAGGAAA
AF5156 .....

                    240     250     260     270     280
Picris CTCTGACCGAGCGACGCCGCGTGGACAATGAAGTACTTCGGTATGTAAG
AF5156 .....A.....

                    290     300     310     320     330
Picris TTCTTTTATTGAAAAAGAAAAATAGTGGAAAACTATCTTGACATTATT
AF5156 .....

                    340     350     360     370     380
Picris CAATGAATAAGCCCCGGCTAATTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATA
AF5156 .....

                    390     400     410     420     430
Picris AGGGGCGAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGTCGCTAGGCGGT
AF5156 .....

                    440     450     460     470     480
Picris TTGATAAGTCTATAGTTTAAATGCAGTGCCTAACGCTGTAGCGCTATAGA
AF5156 .....T.....C.....

                    490     500     510     520     530
Picris AACTGTCTGACTAGAGTTAGATAGAGGCAAGCGGAATTCATGTGTAGCG
AF5156 .....

                    540     550     560     570     580
Picris GTAAAAATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAGAGGCGTAGGCGGCTTGCT
AF5156 .....
```

```

                    590     600     610     620     630
Picris GGGTCTTAAACCGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTA
AF5156 .....T.....

                    640     650     660     670     680
Picris GATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTACTAAGTGTCCGGTTT
AF5156 .....

                    690     700     710     720     730
Picris CGGCTCGGTACTGAAGTTAACACATTAAGTACTCCGCCTGAGTAGTACGT
AF5156 T.....

                    740     750     760     770     780
Picris ACGCAAGTATGAAACTTAAAGGAATTGACGGGACCCCGCACAAGCGGTGG
AF5156 .....

                    790     800     810     820     830
Picris ATCATGTTGTTAATTCGAAGATACACGAAAAACCTTACCAGTCTTGAC
AF5156 .....

                    840     850     860     870     880
Picris ATAATTTTGCACATTATAGAAATATAATGAAGTTATCAGAATTACAGG
AF5156 .....

                    890     900     910     920     930
Picris TGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTAGGTTAAGTCCT
AF5156 .....

                    940     950     960     970     980
Picris AAAACGAGCGCAACCCCTTGTGCTAGTTGCGACCACGTAATGGTGAGCAC
AF5156 .....A.....

                    990     1000     1010     1020     1030
Picris TTTAGCGAGACTGCCAATGAAAAATTGGAGGAAGGTGAGGATTACGTCAA
AF5156 .....

                    1040     1050     1060     1070     1080
Picris ATCATCATGCCCCTTATGATCTGGGCTACAAACGTGATACAAATGGGCTGT
AF5156 .....T..

                    1090     1100     1110     1120     1130
Picris ACAAAGAGTAGCTACAACGTGAGTTTTTAGCCAATCTCAAAAAACAGCC
AF5156 .....T.....

                    1140     1150     1160     1170     1180
Picris TCAGTTCGGATTGAAGTCTGCAACTCGACTTCATGAAGTTGGAATCGCTA
AF5156 .....

                    1190     1200     1210     1220     1230
Picris GTAATCGCGAATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTTCTCGGGGTTGTGACA
AF5156 .....

                    1240
Picris CACCGCCCGTCA-----
AF5156 .....AACCCAGAAAGTTGATAATACCCAAAACCGGTCGCGCTA
```

**Program: needle**  
**# 1: RumexMR1 JQ181547**  
**# 2: M30790**  
**# Score: 6158.0**

```

          10      20      30      40
Rumex  ACGACTGCTAAGACTGGATAGGAGACAAGAGGGCATCTTCTGTTTTTA
M30790  .....A.....

          50      60      70      80      90
Rumex  AAAGACCTAGCAATAGGTATGCTTAGGGAGGAGCTTCGCTCACATTAGTT
M30790  .....

         100     110     120     130     140
Rumex  AGTTGGTGGGGTAAAGGCCAACAAGACTATGATGTGTAGCCGGGTGAG
M30790  .....C.....

         150     160     170     180     190
Rumex  AGGTTGAACGGCCACATTTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGA
M30790  .....

         200     210     220     230     240
Rumex  GGCAGCAGTAGGGAATTTTCGGCAATGGAGGAAACTCTGACCAGCAACG
M30790  .....

         250     260     270     280     290
Rumex  CCGCGTGAACGATGAAGTATTTTCGGTACGTAAAGTTCTTTTATTAGGAA
M30790  .....

         300     310     320     330     340
Rumex  -GAATAAATGATGGAAAAATCATT-CTGACGGTACCTAATGAATAAGCCC
M30790  G.....G.....

         350     360     370     380     390
Rumex  CGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGGGGGCAAGCGTTA
M30790  .....

         400     410     420     430     440
Rumex  TCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCCTAGCCGTTAAATAAGTTTATG
M30790  .....

         450     460     470     480     490
Rumex  GTCTAAGTGCAATGCTCAACATTGTGATGCTATAAAAACTGTTTAGCTAG
M30790  .....

         500     510     520     530     540
Rumex  AGTAAGATAGAGGCAAGTGGAAATCCATGTGTAGTGGTAAAAATGCGTAAA
M30790  .....C.....

         550     560     570     580     590
Rumex  TATATGGAGGAACACCAGTAGCGAAGGCGGCTTGTGGGTCTTTACTGAC
M30790  .....

```

```

          600     610     620     630     640
Rumex  GC'TGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGT
M30790  .....

          650     660     670     680     690
Rumex  CCACGCCGTAAACGATGAGTACTAAACGTTGGGTAAAACAGTGTGAAG
M30790  .....

          700     710     720     730     740
Rumex  TTAACACATTAAGTACTCCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACT
M30790  .....

          750     760     770     780     790
Rumex  TAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTTAATT
M30790  .....

          800     810     820     830     840
Rumex  CGAAGGTACCCGAAAAACCTCACCAGGCTTGACATGCTTCTGCAAAGCT
M30790  .....

          850     860     870     880     890
Rumex  GTAGAAACACAGTGGAGTTATCAGTTGCACAGGTGGTGCATGGTTGTCG
M30790  .....

          900     910     920     930     940
Rumex  TCAGCTCGTGTGATGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCC
M30790  .....

          950     960     970     980     990
Rumex  TTATTGTTAGTTACCAGCACGTAATGGTGGGACTTTAGCAAGACTGCCA
M30790  .....

         1000    1010    1020    1030    1040
Rumex  GTGATAAATGGAGGAAGGTGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCTTA
M30790  .....

         1050    1060    1070    1080    1090
Rumex  TGACCTGGGCTACAAACGTGATACAATGGCTGTACAAAGGGTAGCTGAA
M30790  .....

         1100    1110    1120    1130    1140
Rumex  GCGCAAGTTTTTGGCGAATCTCAAAAAACAGTCTCAGTTCGGATTGAAG
M30790  .....

         1150    1160    1170    1180    1190
Rumex  TCTGCAACTCGACTTCATGAAGTTGGAATCGTAGTAATCGCGAAT-CAG
M30790  .....C...

         1200    1210    1220    1230    1240
Rumex  CATGTCGCGGTGAATACGTTCTCGGGTTTGTACACACCCCGCTCA---
M30790  .....AAC

```

Program: needle  
# 1: RumexSN1 JQ181548  
# 2: M30790  
# Score: 6149.0

```
          10          20          30          40
Rumex  ACGACTGCTAAGACTGGATAGGAGACAAGAGGGCATCTTCTGTTTTTA
M30790  .....A.....

          50          60          70          80          90
Rumex  AAAGACCTAGCAATAGGTATGCTTAGGGAGGAGCTTCGCTCACATTAGTT
M30790  .....

         100         110         120         130         140
Rumex  AGTTGGTGGGGTAAAGGCCAACAAGACTATGATGTGTAGCCGGCTGAG
M30790  .....C.....

         150         160         170         180         190
Rumex  AGGTTGAACGGCCACATTTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGA
M30790  .....

         200         210         220         230         240
Rumex  GGCAGCAGTAGGGAATTTTCGGCAATGGAGGAAACTCTGACCAGCAACG
M30790  .....

         250         260         270         280         290
Rumex  CCGCGTGAACGATGAAGTATTTTCGGTACGTAAAGTTCTTTTATTAGGAA
M30790  .....

         300         310         320         330         340
Rumex  -GAATAAATGATGGAAAAATCATT-CTGACGGTACCTAATGAATAAGCCC
M30790  G.....G.....

         350         360         370         380         390
Rumex  CGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGGGGGCAAGCGTTA
M30790  .....

         400         410         420         430         440
Rumex  TCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCCTAGCCGTTAAATAAGTTTATG
M30790  .....

         450         460         470         480         490
Rumex  GTCTAAGTGCAATGCTCAACATTGTGATGCTATAAAAACTGTTTAGCTAG
M30790  .....

         500         510         520         530         540
Rumex  AGTAAGATAGAGGCAAGTGGAAATCCATGTGTAGTGGTAAAAATGCGTAAA
M30790  .....C.....

         550         560         570         580         590
Rumex  TATATGGAGGAACACCAGTAGCGAAGGCGGCTTGTGGTCTTTACTGAC
M30790  .....
```

```
          600          610          620          630          640
Rumex  GCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGT
M30790  .....

          650          660          670          680          690
Rumex  CCACGCCGTAAACGATGAGTACTAAACGTTGGGTAAAACAGTGTGAAG
M30790  .....

          700          710          720          730          740
Rumex  TTAACACATTAAGTACTCCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACT
M30790  .....

          750          760          770          780          790
Rumex  TAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTTAATT
M30790  .....

          800          810          820          830          840
Rumex  CGAAGGTACCCGAAAAACCTCACCAGGCTTGACATGCTTCTGCAAAGCT
M30790  .....

          850          860          870          880          890
Rumex  GTAGAAACACAGTGGAGGTTATCAGTTGCACAGGTGGTGCATGGTTGTCG
M30790  .....

          900          910          920          930          940
Rumex  TCAGCTCGTGTGATGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCC
M30790  .....

          950          960          970          980          990
Rumex  TTATTGTTAGTTACCAGCACGTAATGGTGGGACTTTAGCAAGACTGCCA
M30790  .....

         1000         1010         1020         1030         1040
Rumex  GTGATAAATGGAGGAAGGTGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCTTA
M30790  .....

         1050         1060         1070         1080         1090
Rumex  TGACCTGGGCTACAAACGTGATACAATGGCTGTACAAAGGGTAGCTGAA
M30790  .....

         1100         1110         1120         1130         1140
Rumex  GCGCAAGTTTTTGGCGAATCTCAAAAAACAGTCTCAGTTCGGATTGAAG
M30790  .....

         1150         1160         1170         1180         1190
Rumex  TCTGCAACTCGACTTCATGAAGTTGGAATCGTAGTAATCGCAAT-CAG
M30790  .....C...

         1200         1210         1220         1230         1240
Rumex  CATGTCGCGGTGAATACGTTACAGGGGTTGTACACACCCCGCTCA---
M30790  .....T.....AAC
```

Program: needle  
# 1: RumexMR2 JQ181549  
# 2: M30790  
# Score: 6122.0

```
      10      20      30      40
Rumex  ACGACTGCTAAGACTGGATAGGAGACAAGAAGGCATCTTCTTGTTTTAA
M30790  .....

      50      60      70      80      90
Rumex  AAAGACCTAGCAATAGGTATGCTTAGGGAGGAGCTTGCCTCACATTAGTT
M30790  .....

     100     110     120     130     140
Rumex  AGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGACTATGATGTGTAGCCGGGTGAG
M30790  .....

     150     160     170     180     190
Rumex  AGGTTGAACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGA
M30790  .....

     200     210     220     230     240
Rumex  GGCAGCAGTAGGGAATTTTCGGCAATGGAGAAACTCTGACCGAGCAACG
M30790  .....

     250     260     270     280     290
Rumex  CCGCGTGAACGATGAAGTATTTTCGGTACGTAAAGTTCTTTTATTAGGAA
M30790  .....

     300     310     320     330     340
Rumex  -GAATAAATGATGGAAAAATCATT-CTGACGGTACCTAATGAATAAGCCC
M30790  G.....G.....

     350     360     370     380     390
Rumex  CGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGGGGGCAAGCGTTA
M30790  .....

     400     410     420     430     440
Rumex  TCCGGAATTTATTGGGCGTAAAGGGTGCCTAGGCGGTTAAATAAGTTTATG
M30790  .....

     450     460     470     480     490
Rumex  GTCTAAGTGCAATGCTCAACATTGTGATGCTATAAAAACTGTTTAGCTAG
M30790  .....

     500     510     520     530     540
Rumex  AGTAAGATAGAGGCAAGTGAATCCATGTGTAGTGGTAAAATGCGTAAA
M30790  .....C.....

     550     560     570     580     590
Rumex  TATATGGAGGAACACCAGTAGCGAAGGCGGCTTGCTGGGTCTTTACTGAC
M30790  .....
```

```
      600      610      620      630      640
Rumex  GC'TGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGAATTAGATACCCCTGTTATT
M30790  .....G.....

      650      660      670      680      690
Rumex  CCACGCGTAAACGAGGAGTACTAAACGTTGGGTAAAACAGTGTGAAG
M30790  .....T.....

      700      710      720      730      740
Rumex  TTAACACATTAAGTACTCCGCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACT
M30790  .....

      750      760      770      780      790
Rumex  TAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTTAAAT
M30790  .....

      800      810      820      830      840
Rumex  CGAAGGTACCCGAAAAACCTCACCAGGTCTTGACATGCTTCTGCAAAGCT
M30790  .....

      850      860      870      880      890
Rumex  GTAGAAACACAGTGGAGTTATCAGTTGCACAGGTGGTGCATGGTTGTCG
M30790  .....

      900      910      920      930      940
Rumex  TCAGCTCGTGTGATGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCC
M30790  .....

      950      960      970      980      990
Rumex  TTATTGTTAGTTACCAGCACGTAATGGTGGGACTTTAGCAAGACTGCCA
M30790  .....

     1000     1010     1020     1030     1040
Rumex  GTGATAAATGGAGGAAGGTGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCTTA
M30790  .....

     1050     1060     1070     1080     1090
Rumex  TGACCTGGGCTACAAACGTGATACAATGGCTGTACAAAGGGTAGCTGAA
M30790  .....

     1100     1110     1120     1130     1140
Rumex  GCGCAAGTTTTTGGCGAATCTCAAAAAACAGTCTCAGTTCGGATTGAAG
M30790  .....

     1150     1160     1170     1180     1190
Rumex  TCTGCAACTCGACTTCATGAAGTTGGAATCGTAGTAGTCGCAAT-CAG
M30790  .....A.....C...

     1200     1210     1220     1230     1240
Rumex  CATGTCGCGGTGAATACGTTACGGGGTTTGTACACACCCGCCGTCA---
M30790  .....T.....AAC
```

Program: needle  
# 1: RumexMA JQ181550  
# 2: M30790  
# Score: 6158.0

```
          10          20          30          40
Rumex  ACGACTGCTAAGACTGGATAGGAGACAAGAAGGCATCTTCTTATTTTAA
M30790  .....G.....

          50          60          70          80          90
Rumex  AAAGACCTAGCAATAGGTATGCTTAGGGAGGAGCTTCCGTCACATTAGTT
M30790  .....

         100         110         120         130         140
Rumex  AGTTGGTGGGGTAAAGGCCACCAAGACTATGATGTGTAGCCGGGTGAG
M30790  .....

         150         160         170         180         190
Rumex  AGGTTGAACGGCCACATTTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGA
M30790  .....

         200         210         220         230         240
Rumex  GGCAGCAGTAGGGAATTTTCGGCAATGGAGGAAACTCTGACCAGCAACG
M30790  .....

         250         260         270         280         290
Rumex  CCGCGTGAACGATGAAGTATTTTCGGTACGTAAAGTTCTTTTATTAGGAA
M30790  .....

         300         310         320         330         340
Rumex  -GAATAAATGATGGAAAAATCATT-CTGACGGTACCTAATGAATAAGCCC
M30790  G.....G.....

         350         360         370         380         390
Rumex  CGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGGGGGCAAGCGTTA
M30790  .....

         400         410         420         430         440
Rumex  TCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCCTAGCCGTTAAATAAGTTTATG
M30790  .....

         450         460         470         480         490
Rumex  GTCTAAGTGCAATGCTCAACATTGTGATGCTATAAAAACTGTTTAGCTAG
M30790  .....

         500         510         520         530         540
Rumex  AGTAAGATAGAGGCAAGTGGAAATCCATGTGTAGTGGTAAAAATGCGTAAA
M30790  .....C.....

         550         560         570         580         590
Rumex  TATATGGAGGAACACCAGTAGCGAAGGCGGCTTGTGGGTCCTTTACTGAC
M30790  .....
```

```
          600          610          620          630          640
Rumex  GCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGT
M30790  .....

          650          660          670          680          690
Rumex  CCACGCCGTAAACGATGAGTACTAAACGTTGGGTAAAACAGTGTGAAG
M30790  .....

          700          710          720          730          740
Rumex  TTAACACATTAAGTACTCCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAGCT
M30790  .....A..

          750          760          770          780          790
Rumex  TAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTTAAAT
M30790  .....

          800          810          820          830          840
Rumex  CGAAGGTACCCGAAAAACCTCACCAGGCTTTGACATGCTTCTGCAAAGCT
M30790  .....

          850          860          870          880          890
Rumex  GTAGAAACACAGTGGAGTTATCAGTTGCACAGGTGGTGCATGGTTGTCG
M30790  .....

          900          910          920          930          940
Rumex  TCAGCTCGTGTGATGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCC
M30790  .....

          950          960          970          980          990
Rumex  TTATTGTTAGTTACCAGCACGTAATGGTGGGACTTTAGCAAGACTGCCA
M30790  .....

         1000         1010         1020         1030         1040
Rumex  GTGATAAATGGAGGAAGGTGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCTTA
M30790  .....

         1050         1060         1070         1080         1090
Rumex  TGACCTGGGCTACAAACGTGATACAATGGCTGTACAAAGGGTAGCTGAA
M30790  .....

         1100         1110         1120         1130         1140
Rumex  GCGCAAGTTTTTGGCGAATCTCAAAAAACAGTCTCAGTTCGGATTGAAG
M30790  .....

         1150         1160         1170         1180         1190
Rumex  TCTGCAACTCGACTTCATGAAGTTGGAATCGTAGTAATCGCGAAT-CAG
M30790  .....C...

         1200         1210         1220         1230         1240
Rumex  CATGTCGCGGTGAATACGTTCTCGGGTTTGTACACACCCCGCTCA---
M30790  .....AAC
```

Program: needle  
# 1: RumexSN2 JQ181551  
# 2: M30790  
# Score: 6158.0

```
          10          20          30          40
Rumex  ACGACTGCTAAGACTGGATAGGAGACAAGAGGGCATCTTCTGTGTTTTTA
M30790  .....A.....

          50          60          70          80          90
Rumex  AAAGACCTAGCAATAGGTATGCTTAGGGAGGAGCTTCGCTCACATTAGTT
M30790  .....

         100         110         120         130         140
Rumex  AGTTGGTGGGGTAAAGGCCAACAAGACTATGATGTGTAGCCGGGTGAG
M30790  .....C.....

         150         160         170         180         190
Rumex  AGGTTGAACGGCCACATTTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGA
M30790  .....

         200         210         220         230         240
Rumex  GGCAGCAGTAGGGAATTTTCGGCAATGGAGGAAACTCTGACCAGCAACG
M30790  .....

         250         260         270         280         290
Rumex  CCGCGTGAACGATGAAGTATTTTCGGTACGTAAAGTTCTTTTATTAGGAA
M30790  .....

         300         310         320         330         340
Rumex  -GAATAAATGATGGAAAAATCATT-CTGACGGTACCTAATGAATAAGCCC
M30790  G.....G.....

         350         360         370         380         390
Rumex  CGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGGGGGCAAGCGTTA
M30790  .....

         400         410         420         430         440
Rumex  TCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCCTAGCCGTTAAATAAGTTTATG
M30790  .....

         450         460         470         480         490
Rumex  GTCTAAGTGAATGCTCAACATTGTGATGCTATAAAAACTGTTTAGCTAG
M30790  .....

         500         510         520         530         540
Rumex  AGTAAGATAGAGGCAAGTGGAAATCCATGTGTAGTGGTAAAAATGCGTAAA
M30790  .....C.....

         550         560         570         580         590
Rumex  TATATGGAGGAACACCAGTAGCGAAGGCGGCTTGTGGGTCTTTACTGAC
M30790  .....
```

```
          600          610          620          630          640
Rumex  GCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGT
M30790  .....

          650          660          670          680          690
Rumex  CCACGCCGTAAACGATGAGTACTAAACGTTGGGTAAAACAGTGTGAAG
M30790  .....

          700          710          720          730          740
Rumex  TTAACACATTAAGTACTCCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACT
M30790  .....

          750          760          770          780          790
Rumex  TAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTTAATT
M30790  .....

          800          810          820          830          840
Rumex  CGAAGGTACCCGAAAAACCTCACCAGGCTTTGACATGCTTCTGCAAAGCT
M30790  .....

          850          860          870          880          890
Rumex  GTAGAAACACAGTGGAGGTTATCAGTTGCACAGGTGGTGCATGGTTGTCG
M30790  .....

          900          910          920          930          940
Rumex  TCAGCTCGTGTGATGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCC
M30790  .....

          950          960          970          980          990
Rumex  TTATTGTTAGTTACCAGCACGTAATGGTGGGACTTTAGCAAGACTGCCA
M30790  .....

         1000         1010         1020         1030         1040
Rumex  GTGATAAATGGAGGAAGGTGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCTTA
M30790  .....

         1050         1060         1070         1080         1090
Rumex  TGACCTGGGCTACAAACGTGATACAATGGCTGTACAAAGGGTAGCTGAA
M30790  .....

         1100         1110         1120         1130         1140
Rumex  GCGCAAGTTTTTGGCGAATCTCAAAAAACAGTCTCAGTTCGGATTGAAG
M30790  .....

         1150         1160         1170         1180         1190
Rumex  TCTGCAACTCGACTTCATGAAGTTGGAATCGTAGTAATCGCAAT-CAG
M30790  .....C...

         1200         1210         1220         1230         1240
Rumex  CATGTCGCGGTGAATACGTTCTCGGGTTTGTACACACCCCGCTCA---
M30790  .....AAC
```

Program: needle  
# 1: Spartium JQ181552  
# 2: X92869  
# Score: 6168.0

```

                                10
Sparti -----ACGACTGCTAAG
X92869 TAAGTAATCTGCCTCTCAGACGAGGATAACAGTTGGAA.....

                                20      30      40      50      60
Sparti ACTGGATAGGAAGTTTAAAGGCATCTTGAAGCTTTTAAAAGACCTGAAAG
X92869 .....A.....

                                70      80      90     100     110
Sparti GGTATGCTGAGAGATGAGCTTGCGGCACATTAGTTAGTTGGTAAGTAAA
X92869 .....

                                120     130     140     150     160
Sparti GGCTTACCAAGACTATGATGTGTAGCTGGACTGAGAGTTGAACGGCCAC
X92869 .....

                                170     180     190     200     210
Sparti ATTGGGACTGAGATACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAA
X92869 .....

                                220     230     240     250     260
Sparti TTTTCGGCAATGGAGGAAACTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAACGATGA
X92869 .....

                                270     280     290     300     310
Sparti AGTATTTTCGGTATGTAAGTTCTTTTATTAAAGAAGAAAAAATGGTGAA
X92869 .....

                                320     330     340     350     360
Sparti AAATCATTCTGACGGTATTTAATGAATAAGCCCCGGCTAACTATGTGCCA
X92869 .....

                                370     380     390     400     410
Sparti GCAGCTGCGGTAATACATAGGGGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCG
X92869 .....

                                420     430     440     450     460
Sparti TAAAGGTGTGTAGCGGTTTAATAAGTCTATGGTGTAAGTGAACGCTC
X92869 .....

                                470     480     490     500     510
Sparti AACGTTGTGAAGCTATAGAAACTGTTAGACTTGAGTTGGATAGAGGCAAG
X92869 .....

                                520     530     540     550     560
Sparti TGGAATFCCATGTGTAGCGGTAATAATGCGTAAAGATATGGAGGAACACCA
X92869 .....
```

```

                                570     580     590     600     610
Sparti GTAGCGAAGGCGGCTTGGCTGGGTCTTAACTGACGCTGAGGCACGAAAGCG
X92869 .....

                                620     630     640     650     660
Sparti TGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATG
X92869 .....

                                670     680     690     700     710
Sparti AGTACTAAGTGTGGGTTAAACCAGTGTGAAGTTAACACATTAAGTACT
X92869 .....

                                720     730     740     750     760
Sparti CCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTTAAAGGAATTGACGGGA
X92869 .....

                                770     780     790     800     810
Sparti CTCCGACAAGCGGTGGATCATGTTGTTAATTCGAAGATACCGCAAAAA
X92869 .....

                                820     830     840     850     860
Sparti CCTTACCAGTCTTGACATAACGTGGCAAAGCTATTGAAAGATAGTGGAG
X92869 .....

                                870     880     890     900     910
Sparti GTTATCCGCGTTACAGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAG
X92869 .....

                                920     930     940     950     960
Sparti ATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTATTGCTAGTTACCAT
X92869 .....

                                970     980     990     1000    1010
Sparti CATTAGTTGGCACTTTAGTGAGACTGCCAATGATAAATGGAGGAAGG
X92869 .....

                                1020    1030    1040    1050    1060
Sparti TGGGGATTACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACAAACGT
X92869 .....

                                1070    1080    1090    1100    1110
Sparti GATACAAATGGCTGTACAAAGAGTAGCTGAAACGCGAGTTCTTAGCCAAT
X92869 .....T.....

                                1120    1130    1140    1150    1160
Sparti CTCAAAAAACAGTCTCAGTTCGGATTGAAGTCTGCAACTCGACTTCATG
X92869 .....

                                1170    1180    1190    1200    1210
Sparti AAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTCGTGGTGAATACGTT
X92869 .....

                                1220    1230
Sparti CACGGGTTTGTACACACCGCCGTC-----
X92869 .T.....AACACGAAAGTTGACAATACCC
```

Program: needle  
# 1: Spartium JQ181553  
# 2: X92869  
# Score: 6176.0

```

                                10
Sparti -----ACGACTGCTAAG
X92869 TAAGTAATCTGCCTCTCAGACGAGGATAACAGTTGGAA.....

                                20      30      40      50      60
Sparti ACTGGATAGGAAGTTTAAAGGCATCTTGAACCTTTTAAAAGACCTGAAAG
X92869 .....

                                70      80      90     100     110
Sparti GGTATGCTGAGAGATGAGCTTGCGGCACATTAGTTAGTTGGTAAGTAAA
X92869 .....

                                120     130     140     150     160
Sparti GGCTTACCAAGACTATGATGTGTAGCTGGACTGAGAGTTGAACGGCCAC
X92869 .....

                                170     180     190     200     210
Sparti ATTGGGACTGAGATACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAA
X92869 .....

                                220     230     240     250     260
Sparti TTTTCGGCAATGGAGGAAACTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAACGATGA
X92869 .....

                                270     280     290     300     310
Sparti AGTATTTTCGGTATGTAAGTTCTTTTATTAAAGAAGAAAAAATGGTGAA
X92869 .....

                                320     330     340     350     360
Sparti AAATCATTCTGACGGTATTTAATGAATAAGCCCCGGCTAACTATGTGCCA
X92869 .....

                                370     380     390     400     410
Sparti GCAGCTGCGGTAATACATAGGGGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCG
X92869 .....

                                420     430     440     450     460
Sparti TAAAGGTGTGTAGCGGTTTAATAAGTCTATGGTGTAAGTGAACGCTC
X92869 .....

                                470     480     490     500     510
Sparti AACGTTGTGAAGCTATAGAAACTGTTAGACTTGAGTTGGATAGAGGCAAG
X92869 .....

                                520     530     540     550     560
Sparti TGGAATFCCATGTGTAGCGGTAATAATGCGTAAAGATATGGAGGAACACCA
X92869 .....
```

```

                                570     580     590     600     610
Sparti GTAGCGAAGCGGCTTGGCTGGGTCTTAACTGACGCTGAGGCACGAAAGCG
X92869 .....

                                620     630     640     650     660
Sparti TGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATG
X92869 .....

                                670     680     690     700     710
Sparti AGTACTAAGTGTGGGTTAAACCAGTGTGAAGTTAACACATTAAGTACT
X92869 .....

                                720     730     740     750     760
Sparti CCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTTAAAGGAATTGACGGGA
X92869 .....

                                770     780     790     800     810
Sparti CTCCGACAAGCGGTGGATCATGTTGTTAATTCGAAGATACCGCAAAAA
X92869 .....

                                820     830     840     850     860
Sparti CCTTACCAGTCTTGACATAACGTGGCAAAGCTATTGAAAGATAGTGGAG
X92869 .....

                                870     880     890     900     910
Sparti GTTATCCACGTTACAGTGGTGCATGGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGCGTGA
X92869 .....G.....-.....

                                920     930     940     950     960
Sparti GATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTTATTGCTAGTTACCA
X92869 .....

                                970     980     990     1000    1010
Sparti TCATTTAGTTGGGCACTTTAGTGAGACTGCCAATGATAAATGGAGGAAG
X92869 .....

                                1020    1030    1040    1050    1060
Sparti GTGGGGATTACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACAAACG
X92869 .....

                                1070    1080    1090    1100    1110
Sparti TGATACAATGGCTGTTACAAAGAGTAGCTGAAACGTGAGTTCTTAGCCAA
X92869 .....

                                1120    1130    1140    1150    1160
Sparti TCTCAAAAAACAGTCTCAGTTCGGATTGAAGTCTGCAACTCGACTTCAT
X92869 .....

                                1170    1180    1190    1200    1210
Sparti GAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTCGTTGGTGAATACGT
X92869 .....

                                1220    1230    1240
Sparti TCTCGGGTTTGTACACACCGCCCGTCA-----
X92869 .....AACCACGAAAGTTGACAATACC
```

# Program: needle  
# 1: Spartium JQ181554  
# 2: AF176319  
# Score: 6171.0

```
Sparti -----ACGACT
AF1763 AACACGTAAGTAACCTACCTTTAAGACGAGGATAACAATCGGAA...GT.

      10      20      30      40      50
Sparti GCTAAGACTGGATAGGAAACAGAAAGGCATCTTTTGTTTTTTAAAGACC
AF1763 .....

      60      70      80      90     100
Sparti TTCTTCGGAGGGTATGCTTAAAGAGGGGCTTGCGCCACATTAGTTAGTTG
AF1763 .....

      110     120     130     140     150
Sparti GTGAGGTAAGGCTTACCAAGATTATGATGTGTAGCTGGACTGAGAGGTT
AF1763 .....

      160     170     180     190     200
Sparti GAACAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGCGCG
AF1763 .....A.

      210     220     230     240     250
Sparti CAGTAGGGAATTTTCGGCAATGGAGGAACTCTGACCGAGCGACGCCGCG
AF1763 .....

      260     270     280     290     300
Sparti TGAACGATGAAGTATTTTCGGTATGTAAAGTCTTTTATTGAAGAAGAAA
AF1763 .....

      310     320     330     340     350
Sparti AATAGTGAAAAACTATCTTGACGTTATTCAATGAATAAGCCCCGGCTAA
AF1763 .....

      360     370     380     390     400
Sparti CTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACATAGGGGGCGAGCGTTATCCGGAA
AF1763 .....

      410     420     430     440     450
Sparti TTATTGGGCGTAAAGGGTGCCTAGGCGGTTAGATAAGTCTATAATTTAAT
AF1763 .....

      460     470     480     490     500
Sparti TTCAGTGCTTAACGCTGTCTTGTATAGAAACTGTCTTGACTAGAGTGAG
AF1763 .....

      510     520     530     540     550
Sparti ATAGAGGCAAGCGGAATTCATGTGTAGCGGTAAAATGTGTAATATATG
AF1763 .....
```

```
      560     570     580     590     600
Sparti GAGGAACACCAGAACCGTAGGCGGCTTGCTGGGTCTTTACTGACCGTGAG
AF1763 .....

      610     620     630     640     650
Sparti GCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGC
AF1763 .....

      660     670     680     690     700
Sparti TGTAACGATGAGTACTAAGTGTCTGGGTAACCTCGGTACTGAAGTTAACA
AF1763 .....

      710     720     730     740     750
Sparti CATTAAAGTACTCCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTTAAAGG
AF1763 .....

      760     770     780     790     800
Sparti AATTGACGGGACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTTAAATCGAAGA
AF1763 .....

      810     820     830     840     850
Sparti TACACGAAAAACCTTACCAGGCTTGACATACTCTGCAAAGCTATAGAAA
AF1763 .....

      860     870     880     890     900
Sparti TATAGTGGAGGTTATCAGGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGTTC
AF1763 .....

      910     920     930     940     950
Sparti GTGTCGTGAGATGTTAGGTTAAGTCTAAAACGAACGCAACCCTGTCCG
AF1763 .....

      960     970     980     990    1000
Sparti TAGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGACTTTAGCGAGACTGCCAATTAAC
AF1763 .....

      1010    1020    1030    1040    1050
Sparti ATTGGAGGAAGGTGGGGATAACGCCAAATCATCATGCCCTTATGATCTG
AF1763 .....T.....

      1060    1070    1080    1090    1100
Sparti GGTACAAAACGTGATACAATGGCTATTACAAAGAGTAGCTGAAACCGCGAG
AF1763 .....

      1110    1120    1130    1140    1150
Sparti TTTTGTAGCAATCTCAAAAAGATAGTCTCAGTACGGATTGAAGTCTGCAA
AF1763 .....G.....

      1160    1170    1180    1190    1200
Sparti CTCGACTTCATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTCCG
AF1763 .....

      1210    1220    1230    1240
Sparti GGTGAATACGTTTCGCGGGTGTGTACACACCGCCGCTCA-----
AF1763 .....T.....AACACGAAAG
```

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment  
ops=Opuntia subulata; opf= Opuntia ficus indica; aus=Austrocyliindropuntia vs  
reference U15442 ('Ca.Phytoplasma aurantifolia)

```

ops      ACCTGCTAAGACTGGATAGGAAGAAATAAGGCATCTTATTTCTTTTAAAAGACCTAGT 60
Opf      ACCTGCTAAGACTGGATAGGAAGAAATAAGGCATCTTATTTCTTTTAAAAGACCTAGT 60
aus      ATTA CTGCTAAGACTGGATAGGAAGAAATAAGGCATCTTATTTCTTTTAAAAGACCTAGT 60
U15442   ACAGTGGCTAAGACTGGATAGGAAGAAATAAGGCATCTTATTTCTTTTAAAAGACCTAGT 60
*          *****

ops      AATAGGTATACTTTAGGAGGGGCTTGC GCCATATTAGTTAGTTGGTAGGGTAATGGCCTA 120
Opf      AATAGGTATACTTTAGGAGGGGCTTGC GCCATATTAGTTAGTTGGTAGGGTAATGGCCTA 120
aus      AATAGGTATACTTTAGGAGGGGCTTGC GCCATATTAGTTAGTTGGTAGGGTAATGGCCTA 120
U15442   GATAGGTATACTTTAGGAGGGGCTTGC GCCATATTAGTTAGTTGGTAGGGTAATGGCCTA 120
*          *****

ops      CCAAGACGATGATGTGTAGCTGGACTGAGAGGTTGAACAGCCACATTGGGACTGAGACAC 180
Opf      CCAAGACGATGATGTGTAGCTGGACTGAGAGGTTGAACAGCCACATTGGGACTGAGACAC 180
aus      CCAAGACGATGATGTGTAGCTGGACTGAGAGGTTGAACAGCCACATTGGGACTGAGACAC 180
U15442   CCAAGACGATGATGTGTAGCTGGACTGAGAGGTTGAACAGCCACATTGGGACTGAGACAC 180
*          *****

ops      GGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAAAGGAATTTTCGGCAATGGAGGAAACTCTGAC 240
Opf      GGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAAAGGAATTTTCGGCAATGGAGGAAACTCTGAC 240
aus      GGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAAAGGAATTTTCGGCAATGGAGGAAACTCTGAC 240
U15442   GGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAAAGGAATTTTCGGCAATGGAGGAAACTCTGAC 240
*          *****

ops      CGACCAACGCCGCGTGAACGACGAAGTACTTTGGTATGTAAAGTTCTTTTATCAAGGAA 299
Opf      CGACCAACGCCGCGTGAACGACGAAGTACTTTGGTATGTAAAGTTCTTTTATCAAGGAA 299
aus      CGACCAACGCCGCGTGAACGACGAAGTACTTTGGTATGTAAAGTTCTTTTATCAAGGAA 299
U15442   CGAGCAACGCCGCGTGAACGACGAAGTACTTTGGTATGTAAAGTTCTTTTATCAAGGAA 300
*          *****

ops      GAAAAGCAAGTGGCGAACCATTGTGTTGCCGGTACTTGATGAATAAGCCCCGGCTAATTA 359
Opf      GAAAAGCAAGTGGCGAACCATTGTGTTGCCGGTACTTGATGAATAAGCCCCGGCTAATTA 359
aus      GAAAAGCAAGTGGCGAACCATTGTGTTGCCGGTACTTGATGAATAAGCCCCGGCTAATTA 359
U15442   GAAAAGCAAGTGGTGAACCATTGTGTTGCCGGTACTTGATGAATAAGCCCCGGCTAATTA 360
*          *****

ops      TGTGCCAGCAGCCCGGTAAAGACATAAGGGGCAAGTGTATCCGGAATTATTGGGCGTAA 419
Opf      TGTGCCAGCAGCCCGGTAAAGACATAAGGGGCAAGTGTATCCGGAATTATTGGGCGTAA 419
aus      TGTGCCAGCAGCCCGGTAAAGACATAAGGGGCAAGTGTATCCGGAATTATTGGGCGTAA 419
U15442   TGTGCCAGCAGCCCGGTAAAGACATAAGGGGCAAGTGTATCCGGAATTATTGGGCGTAA 420
*          *****

ops      AGGGTGCCTAGGCGGTCTAGTAAGTCACTGGTGAATGGCAACGCTCAACGTTGTCCGGC 479
Opf      AGGGTGCCTAGGCGGTCTAGTAAGTCACTGGTGAATGGCAACGCTCAACGTTGTCCGGC 479
aus      AGGGTGCCTAGGCGGTCTAGTAAGTCACTGGTGAATGGCAACGCTCAACGTTGTCCGGC 479
U15442   AGGGTGCCTAGGCGGTCTAGTAAGTCACTGGTGAATGGCAACGCTCAACGTTGTCCGGC 480
*          *****

ops      TATTGAACTGCTAAACTTGAGTTAGATAGAGGCGAGTGAATCCATGTGTAGCGCTAA 539
Opf      TATTGAACTGCTAAACTTGAGTTAGATAGAGGCGAGTGAATCCATGTGTAGCGCTAA 539
aus      TATTGAACTGCTAAACTTGAGTTAGATAGAGGCGAGTGAATCCATGTGTAGCGCTAA 539
U15442   TATTGAACTGCTAAACTTGAGTTAGATAGAGGCGAGTGAATCCATGTGTAGCGCTAA 539
*          *****

ops      AATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAGAGGCGTAGGCGGCTCGTGGGTCTTAACTGAC 599
Opf      AATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAGAGGCGTAGGCGGCTCGTGGGTCTTAACTGAC 599
aus      AATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAGAGGCGTAGGCGGCTCGTGGGTCTTAACTGAC 599
U15442   AATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAGAGGCGTAGGCGGCTCGTGGGTCTTAACTGAC 599
*          *****

ops      GCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTA 659
Opf      GCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTA 659
aus      GCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTA 659
U15442   GCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTA 659
*          *****

ops      AACGATGAGTACTAAGTGTCCGGTTAAACCGGTAAGTGAAGTTAACACATTAAGTACTCCG 719
Opf      AACGATGAGTACTAAGTGTCCGGTTAAACCGGTAAGTGAAGTTAACACATTAAGTACTCCG 719
aus      AACGATGAGTACTAAGTGTCCGGTTAAACCGGTAAGTGAAGTTAACACATTAAGTACTCCG 719
U15442   AACGATGAGTACTAAGTGTCCGGTTAAACCGGTAAGTGAAGTTAACACATTAAGTACTCCG 719
*          *****

```

```

ops      CCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCG 779
Opf      CCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCG 779
aus      CCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCG 779
U15442   CCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTTAAAGGAATTGACGGGACTC-GCACAAGCG 778
*****

ops      GTGGATCATGTTGTTTAATTCGAAGATACCCGAAAAACCTTACCAGGTCTTGACATGTTT 839
Opf      GTGGATCATGTTGTTTAATTCGAAGATACCCGAAAAACCTTACCAGGTCTTGACATGTTT 839
aus      GTGGATCATGTTGTTTAATTCGAAGATACCCGAAAAACCTTACCAGGTCTTGACATGTTT 839
U15442   GTGGATCATGTTGTTTAATTCGAAGATACCCGAAAAACCTTACCAGGTCTTGACATGTTT 838
*****

ops      TTGCGAAACGGTAGTAATATCGTGGAGGTTATCAGAAACACAGGTGGTGCATGGTTGTGC 899
Opf      TTGCGAAACGGTAGTAATATCGTGGAGGTTATCAGAAACACAGGTGGTGCATGGTTGTGC 899
aus      TTGCGAAACGGTAGTAATATCGTGGAGGTTATCAGAAACACAGGTGGTGCATGGTTGTGC 899
U15442   TTGCGAAACGGTAGTAATATCGTGGAGGTTATCAGAAACACAGGTGGTGCATGGTTGTGC 898
*****

ops      TCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTAGGTTAAGTCCTAAAACGAGCGAAACCCCTTATCGTTA 958
Opf      TCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTAGGTTAAGTCCTAAAACGAGCGAAACCCCTTATCGTTA 958
aus      TCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTAGGTTAAGTCCTAAAACGAGCGAAACCCCTTATCGTTA 958
U15442   TCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTAGGTTAAGTCCTAAAACGAGCGAAACCCCTTATCGTTA 958
*****

ops      GTTGCCAGCACGTTATGGTGGGGACTTTAACGAGACTGCCAGTGATAAAATGGAGGAAGG 1018
Opf      GTTGCCAGCACGTTATGGTGGGGACTTTAACGAGACTGCCAGTGATAAAATGGAGGAAGG 1018
aus      GTTGCCAGCACGTTATGGTGGGGACTTTAACGAGACTGCCAGTGATAAAATGGAGGAAGG 1018
U15442   GTTGCCAGCACGTTATGGTGGGGACTTTAACGAGACTGCCAGTGATAAAATGGAGGAAGG 1018
*****

ops      TGAGGATCACGTCAAATCAGCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACAAACGTGATAACAATGG 1078
Opf      TGAGGATCACGTCAAATCAGCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACAAACGTGATAACAATGG 1078
aus      TGAGGATCACGTCAAATCAGCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACAAACGTGATAACAATGG 1078
U15442   TGAGGATCACGTCAAATCAGCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACAAACGTGATAACAATGG 1078
*****

ops      CTGTTACAAAGGGTAGCTGAAACGTAAGTTCTTGGCCAATCCCCAAAAACAGTCTCAGTC 1138
Opf      CTGTTACAAAGGGTAGCTGAAACGTAAGTTCTTGGCCAATCCCCAAAAACAGTCTCAGTC 1138
aus      CTGTTACAAAGGGTAGCTGAAACGTAAGTTCTTGGCCAATCCCCAAAAACAGTCTCAGTC 1138
U15442   CTGTTACAAAGGGTAGCTGAAACGTAAGTTCTTGGCCAATCCCCAAAAACAGTCTCAGTC 1138
*****

ops      CGGATTGAAGTCTGCAACTCGACTTCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGC 1198
Opf      CGGATTGAAGTCTGCAACTCGACTTCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGC 1198
aus      CGGATTGAAGTCTGCAACTCGACTTCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGC 1198
U15442   CGGATTGAAGTCTGCAACTCGACTTCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGC 1198
*****

ops      ATGTCGCGGTGAATACGTTCCGGGGTTTGTACACACCCGCCGTC 1244
Opf      ATGTCGCGGTGAATACGTTCCGGGGTTTGTACACACCCGCCGTC 1244
aus      ATGTCGCGGTGAATACGTTCCGGGGTTTGTACACACCCGCCGTC 1244
U15442   ATGTCGCGGTGAATACGTTCCGGGGTTTGTACACACCCGCCGTC 1245
*****

```

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment  
Rumex vari vs reference M30790 (Ca. *Phytoplasma asteris*)

```
MR1      ACGACTGCTAAGACTGGATAGGAGACAAGA GGCATCTTCTTGTTTTTAAAAGACCTAGC 60
SN2      ACGACTGCTAAGACTGGATAGGAGACAAGA GGCATCTTCTTGTTTTTAAAAGACCTAGC 60
SN1      ACGACTGCTAAGACTGGATAGGAGACAAGA GGCATCTTCTTGTTTTTAAAAGACCTAGC 60
MA       ACGACTGCTAAGACTGGATAGGAGACAAGAAGGCATCTTCTT TTTTTAAAAGACCTAGC 60
M30790  ACGACTGCTAAGACTGGATAGGAGACAAGAAGGCATCTTCTT TTTTTAAAAGACCTAGC 60
MR2      ACGACTGCTAAGACTGGATAGGAGACAAGAAGGCATCTTCTT TTTTTAAAAGACCTAGC 60
*****

MR1      AATAGGTATGCTTAGGGAGGAGCTTGCCTCACATTAGTTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTA 120
SN2      AATAGGTATGCTTAGGGAGGAGCTTGCCTCACATTAGTTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTA 120
SN1      AATAGGTATGCTTAGGGAGGAGCTTGCCTCACATTAGTTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTA 120
MA       AATAGGTATGCTTAGGGAGGAGCTTGCCTCACATTAGTTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTA 120
M30790  AATAGGTATGCTTAGGGAGGAGCTTGCCTCACATTAGTTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTA 120
MR2      AATAGGTATGCTTAGGGAGGAGCTTGCCTCACATTAGTTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTA 120
*****

MR1      ACAAGACTATGATGTGTAGCCGGCTGAGAGGTTGAACGGCCACATTGGGACTGAGACAC 180
SN2      ACAAGACTATGATGTGTAGCCGGCTGAGAGGTTGAACGGCCACATTGGGACTGAGACAC 180
SN1      ACAAGACTATGATGTGTAGCCGGCTGAGAGGTTGAACGGCCACATTGGGACTGAGACAC 180
MA       CCAAGACTATGATGTGTAGCCGGCTGAGAGGTTGAACGGCCACATTGGGACTGAGACAC 180
M30790  CCAAGACTATGATGTGTAGCCGGCTGAGAGGTTGAACGGCCACATTGGGACTGAGACAC 180
MR2      CCAAGACTATGATGTGTAGCCGGCTGAGAGGTTGAACGGCCACATTGGGACTGAGACAC 180
*****

MR1      GGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTTCGGCAATGGAGGAAACTCTGAC 240
SN2      GGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTTCGGCAATGGAGGAAACTCTGAC 240
SN1      GGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTTCGGCAATGGAGGAAACTCTGAC 240
MA       GGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTTCGGCAATGGAGGAAACTCTGAC 240
M30790  GGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTTCGGCAATGGAGGAAACTCTGAC 240
MR2      GGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTTCGGCAATGGAGGAAACTCTGAC 240
*****

MR1      CGAGCAACGCGCGTGAACGATGAAGTATTTTCGGTACGTAAAGTTCTTTTATTAGGGAAG 300
SN2      CGAGCAACGCGCGTGAACGATGAAGTATTTTCGGTACGTAAAGTTCTTTTATTAGGGAAG 300
SN1      CGAGCAACGCGCGTGAACGATGAAGTATTTTCGGTACGTAAAGTTCTTTTATTAGGGAAG 300
MA       CGAGCAACGCGCGTGAACGATGAAGTATTTTCGGTACGTAAAGTTCTTTTATTAGGGAAG 300
M30790  CGAGCAACGCGCGTGAACGATGAAGTATTTTCGGTACGTAAAGTTCTTTTATTAGGGAAG 300
MR2      CGAGCAACGCGCGTGAACGATGAAGTATTTTCGGTACGTAAAGTTCTTTTATTAGGGAAG 300
*****

MR1      AATAAATGATGGAAAAATCATT CTGACGGTACCTAATGAATAAGCCCCGGCTAACTAT 358
SN2      AATAAATGATGGAAAAATCATT CTGACGGTACCTAATGAATAAGCCCCGGCTAACTAT 358
SN1      AATAAATGATGGAAAAATCATT CTGACGGTACCTAATGAATAAGCCCCGGCTAACTAT 358
MA       AATAAATGATGGAAAAATCATT CTGACGGTACCTAATGAATAAGCCCCGGCTAACTAT 358
M30790  AATAAATGATGGAAAAATCATT CTGACGGTACCTAATGAATAAGCCCCGGCTAACTAT 358
MR2      AATAAATGATGGAAAAATCATT CTGACGGTACCTAATGAATAAGCCCCGGCTAACTAT 358
*****

MR1      GTGCCAGCAGCCGCGTAAATACATAGGGGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAA 418
SN2      GTGCCAGCAGCCGCGTAAATACATAGGGGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAA 418
SN1      GTGCCAGCAGCCGCGTAAATACATAGGGGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAA 418
MA       GTGCCAGCAGCCGCGTAAATACATAGGGGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAA 418
M30790  GTGCCAGCAGCCGCGTAAATACATAGGGGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAA 420
MR2      GTGCCAGCAGCCGCGTAAATACATAGGGGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAA 418
*****

MR1      GGGTGCCTAGGCGGTTAAATAAGTTTATGGTCTAAGTGCAATGCTCAACATTGTGATGCT 478
SN2      GGGTGCCTAGGCGGTTAAATAAGTTTATGGTCTAAGTGCAATGCTCAACATTGTGATGCT 478
SN1      GGGTGCCTAGGCGGTTAAATAAGTTTATGGTCTAAGTGCAATGCTCAACATTGTGATGCT 478
MA       GGGTGCCTAGGCGGTTAAATAAGTTTATGGTCTAAGTGCAATGCTCAACATTGTGATGCT 478
M30790  GGGTGCCTAGGCGGTTAAATAAGTTTATGGTCTAAGTGCAATGCTCAACATTGTGATGCT 480
MR2      GGGTGCCTAGGCGGTTAAATAAGTTTATGGTCTAAGTGCAATGCTCAACATTGTGATGCT 478
*****

MR1      ATAAAACTGTTTAGCTAGAGTAAGATAGAGGCAAG GGAATCCATGTGTAGTGGTAAA 538
SN2      ATAAAACTGTTTAGCTAGAGTAAGATAGAGGCAAG GGAATCCATGTGTAGTGGTAAA 538
SN1      ATAAAACTGTTTAGCTAGAGTAAGATAGAGGCAAG GGAATCCATGTGTAGTGGTAAA 538
MA       ATAAAACTGTTTAGCTAGAGTAAGATAGAGGCAAG GGAATCCATGTGTAGTGGTAAA 538
M30790  ATAAAACTGTTTAGCTAGAGTAAGATAGAGGCAAG GGAATCCATGTGTAGTGGTAAA 540
MR2      ATAAAACTGTTTAGCTAGAGTAAGATAGAGGCAAG GGAATCCATGTGTAGTGGTAAA 538
*****

MR1      ATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAGTAGCGAAGGCGGCTTGCTGGGCTTTTACTGACG 598
SN2      ATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAGTAGCGAAGGCGGCTTGCTGGGCTTTTACTGACG 598
SN1      ATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAGTAGCGAAGGCGGCTTGCTGGGCTTTTACTGACG 598
MA       ATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAGTAGCGAAGGCGGCTTGCTGGGCTTTTACTGACG 598
M30790  ATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAGTAGCGAAGGCGGCTTGCTGGGCTTTTACTGACG 600
MR2      ATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAGTAGCGAAGGCGGCTTGCTGGGCTTTTACTGACG 598
*****
```

MR1 CTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAA 658  
SN2 CTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAA 658  
SN1 CTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAA 658  
MA CTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAA 658  
M30790 CTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAA 660  
MR2 CTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAA 658  
\*\*\*\*\*

MR1 ACGATGAGTACTAAACGTTGGGTAAAACCAGTGTGAAGTTAACACATTAAGTACTCCGC 718  
SN2 ACGATGAGTACTAAACGTTGGGTAAAACCAGTGTGAAGTTAACACATTAAGTACTCCGC 718  
SN1 ACGATGAGTACTAAACGTTGGGTAAAACCAGTGTGAAGTTAACACATTAAGTACTCCGC 718  
MA ACGATGAGTACTAAACGTTGGGTAAAACCAGTGTGAAGTTAACACATTAAGTACTCCGC 718  
M30790 ACGATGAGTACTAAACGTTGGGTAAAACCAGTGTGAAGTTAACACATTAAGTACTCCGC 720  
MR2 ACGATGAGTACTAAACGTTGGGTAAAACCAGTGTGAAGTTAACACATTAAGTACTCCGC 718  
\*\*\*\*\*

MR1 CTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCGG 778  
SN2 CTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCGG 778  
SN1 CTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCGG 778  
MA CTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCGG 778  
M30790 CTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCGG 780  
MR2 CTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCGG 778  
\*\*\*\*\*

MR1 TGGATCATGTTGTTAATTCGAAGGTACCCGAAAAACCTCACCAGGTCCTTGACATGCTTC 838  
SN2 TGGATCATGTTGTTAATTCGAAGGTACCCGAAAAACCTCACCAGGTCCTTGACATGCTTC 838  
SN1 TGGATCATGTTGTTAATTCGAAGGTACCCGAAAAACCTCACCAGGTCCTTGACATGCTTC 838  
MA TGGATCATGTTGTTAATTCGAAGGTACCCGAAAAACCTCACCAGGTCCTTGACATGCTTC 838  
M30790 TGGATCATGTTGTTAATTCGAAGGTACCCGAAAAACCTCACCAGGTCCTTGACATGCTTC 840  
MR2 TGGATCATGTTGTTAATTCGAAGGTACCCGAAAAACCTCACCAGGTCCTTGACATGCTTC 838  
\*\*\*\*\*

MR1 TGCAAAGCTGTAGAAACACAGTGGAGGTTATCAGTTGCACAGGTGGTGCATGGTTGTCGT 898  
SN2 TGCAAAGCTGTAGAAACACAGTGGAGGTTATCAGTTGCACAGGTGGTGCATGGTTGTCGT 898  
SN1 TGCAAAGCTGTAGAAACACAGTGGAGGTTATCAGTTGCACAGGTGGTGCATGGTTGTCGT 898  
MA TGCAAAGCTGTAGAAACACAGTGGAGGTTATCAGTTGCACAGGTGGTGCATGGTTGTCGT 898  
M30790 TGCAAAGCTGTAGAAACACAGTGGAGGTTATCAGTTGCACAGGTGGTGCATGGTTGTCGT 900  
MR2 TGCAAAGCTGTAGAAACACAGTGGAGGTTATCAGTTGCACAGGTGGTGCATGGTTGTCGT 898  
\*\*\*\*\*

MR1 CAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGT 958  
SN2 CAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGT 958  
SN1 CAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGT 958  
MA CAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGT 958  
M30790 CAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGT 960  
MR2 CAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGT 958  
\*\*\*\*\*

MR1 TACCAGCACGTAATGGTGGGGACTTTAGCAAGACTGCCAGTGATAAATGGAGGAAGGTG 1018  
SN2 TACCAGCACGTAATGGTGGGGACTTTAGCAAGACTGCCAGTGATAAATGGAGGAAGGTG 1018  
SN1 TACCAGCACGTAATGGTGGGGACTTTAGCAAGACTGCCAGTGATAAATGGAGGAAGGTG 1018  
MA TACCAGCACGTAATGGTGGGGACTTTAGCAAGACTGCCAGTGATAAATGGAGGAAGGTG 1018  
M30790 TACCAGCACGTAATGGTGGGGACTTTAGCAAGACTGCCAGTGATAAATGGAGGAAGGTG 1020  
MR2 TACCAGCACGTAATGGTGGGGACTTTAGCAAGACTGCCAGTGATAAATGGAGGAAGGTG 1018  
\*\*\*\*\*

MR1 GGGACGACGTC A AATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACAAACGTGATACAATGGCT 1078  
SN2 GGGACGACGTC A AATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACAAACGTGATACAATGGCT 1078  
SN1 GGGACGACGTC A AATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACAAACGTGATACAATGGCT 1078  
MA GGGACGACGTC A AATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACAAACGTGATACAATGGCT 1078  
M30790 GGGACGACGTC A AATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACAAACGTGATACAATGGCT 1080  
MR2 GGGACGACGTC A AATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACAAACGTGATACAATGGCT 1078  
\*\*\*\*\*

MR1 GTTACAAAGGGTAGCTGAAGCGCAAGTTTTTGGCGAATCTCAAAAAACAGTCTCAGTTC 1138  
SN2 GTTACAAAGGGTAGCTGAAGCGCAAGTTTTTGGCGAATCTCAAAAAACAGTCTCAGTTC 1138  
SN1 GTTACAAAGGGTAGCTGAAGCGCAAGTTTTTGGCGAATCTCAAAAAACAGTCTCAGTTC 1138  
MA GTTACAAAGGGTAGCTGAAGCGCAAGTTTTTGGCGAATCTCAAAAAACAGTCTCAGTTC 1138  
M30790 GTTACAAAGGGTAGCTGAAGCGCAAGTTTTTGGCGAATCTCAAAAAACAGTCTCAGTTC 1140  
MR2 GTTACAAAGGGTAGCTGAAGCGCAAGTTTTTGGCGAATCTCAAAAAACAGTCTCAGTTC 1138  
\*\*\*\*\*

MR1 GGATTGAAGTCTGCAACTCGACTTCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATC-AGC 1197  
SN2 GGATTGAAGTCTGCAACTCGACTTCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATC-AGC 1197  
SN1 GGATTGAAGTCTGCAACTCGACTTCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATC-AGC 1197  
MA GGATTGAAGTCTGCAACTCGACTTCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATC-AGC 1197  
M30790 GGATTGAAGTCTGCAACTCGACTTCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATC-AGC 1200  
MR2 GGATTGAAGTCTGCAACTCGACTTCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATC-AGC 1197  
\*\*\*\*\*

```
MR1      ATGTCGCGGTGAATACGTTCTCGGGGTTTGTACACACCGCCCGTCA 1243
SN2      ATGTCGCGGTGAATACGTTCTCGGGGTTTGTACACACCGCCCGTCA 1243
SN1      ATGTCGCGGTGAATACGTTCTCGGGGTTTGTACACACCGCCCGTCA 1243
MA       ATGTCGCGGTGAATACGTTCTCGGGGTTTGTACACACCGCCCGTCA 1243
M30790  ATGTCGCGGTGAATACGTTCTCGGGGTTTGTACACACCGCCCGTCA 1256
MR2      ATGTCGCGGTGAATACGTTCTCGGGGTTTGTACACACCGCCCGTCA 1243
*****
```



```

spaCB      GCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA 655
X92869    GCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA 655
spaSA     GCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA 655
spaMS     GCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA 660
AF176319  GCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA 660
*****

spaCB      AACGATGAGTACTAAGTGTGGGTTAAACCAGTGTGAAGTTAACACATTAAGTACTCCG 715
X92869    AACGATGAGTACTAAGTGTGGGTTAAACCAGTGTGAAGTTAACACATTAAGTACTCCG 715
spaSA     AACGATGAGTACTAAGTGTGGGTTAAACCAGTGTGAAGTTAACACATTAAGTACTCCG 715
spaMS     AACGATGAGTACTAAGTGTGGGTTAAACCAGTGTGAAGTTAACACATTAAGTACTCCG 720
AF176319  AACGATGAGTACTAAGTGTGGGTTAAACCAGTGTGAAGTTAACACATTAAGTACTCCG 720
*****

spaCB      CCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCG 775
X92869    CCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCG 775
spaSA     CCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCG 775
spaMS     CCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCG 780
AF176319  CCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCG 780
*****

spaCB      GTGGATCATGTTGTTTAAATTCGAAGATACGCGAAAAACCTTACCAGGTCTTGACATAACG 835
X92869    GTGGATCATGTTGTTTAAATTCGAAGATACGCGAAAAACCTTACCAGGTCTTGACATAACG 835
spaSA     GTGGATCATGTTGTTTAAATTCGAAGATACGCGAAAAACCTTACCAGGTCTTGACATAACG 835
spaMS     GTGGATCATGTTGTTTAAATTCGAAGATACGCGAAAAACCTTACCAGGTCTTGACATAACT 840
AF176319  GTGGATCATGTTGTTTAAATTCGAAGATACGCGAAAAACCTTACCAGGTCTTGACATAACT 840
*****

spaCB      TGGCAAAGCTATTGAAAGATAGTGGAGGTTATCCACGTTACAGGTGGTGCATGGGTTGTC 895
X92869    TGGCAAAGCTATTGAAAGATAGTGGAGGTTATCCGCGTTACAGGTGGTGCATGG-TTGT 894
spaSA     TGGCAAAGCTATTGAAAGATAGTGGAGGTTATCCGCGTTACAGGTGGTGCATGG-TTGT 894
spaMS     TG-CAAAGCTATAGAAATATAGTGGAGGTTATCAGGGATACAGGTGGTGCATGG-TTGT 898
AF176319  TG-CAAAGCTATAGAAATATAGTGGAGGTTATCAGGGATACAGGTGGTGCATGG-TTGT 898
** ***** * *****

spaCB      GTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATTGCTA 955
X92869    GTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATTGCTA 954
spaSA     GTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATTGCTA 954
spaMS     GTCAGTTCGTGTCTGAGATGTTAGGTTAAGTCTTAAACGAACGCAACCCCTTGGAGGCTA 958
AF176319  GTCAGTTCGTGTCTGAGATGTTAGGTTAAGTCTTAAACGAACGCAACCCCTTGTGCTA 958
*****

spaCB      GTTACCATCATTAGT--TGGGCACTTTAGTGAGACTGCCAATGATAAATGGAGGAAGG 1013
X92869    GTTACCATCATTAGT--TGGGCACTTTAGTGAGACTGCCAATGATAAATGGAGGAAGG 1012
spaSA     GTTACCATCATTAGT--TGGGCACTTTAGTGAGACTGCCAATGATAAATGGAGGAAGG 1012
spaMS     GTTGCCAGCACGTAATGGTGGGACTTTAGCGAGACTGCCAATTAACATGGAGGAAGG 1018
AF176319  GTTGCCAGCACGTAATGGTGGGACTTTAGCGAGACTGCCAATTAACATGGAGGAAGG 1018
*** ** * * * * *

spaCB      TGGGGATTACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACAACCGTGATACAATGG 1073
X92869    TGGGGATTACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACAACCGTGATACAATGG 1072
spaSA     TGGGGATTACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACAACCGTGATACAATGG 1072
spaMS     TGGGGATAACGCCAAATCATCATGCCCCCTTATGATCTGGGCTACAACCGTGATACAATGG 1078
AF176319  TGGGGATAACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGATCTGGGCTACAACCGTGATACAATGG 1078
*****

spaCB      CTGTTACAAAGAGTAGCTGAAACGTGAGTTCTTAGCCAATCTCAAAAAACAGTCTCAGT 1133
X92869    CTGTTACAAAGAGTAGCTGAAACGTGAGTTCTTAGCCAATCTCAAAAAACAGTCTCAGT 1132
spaSA     CTGTTACAAAGAGTAGCTGAAACCGCGAGTTCTTAGCCAATCTCAAAAAACAGTCTCAGT 1132
spaMS     CTATTACAAAGAGTAGCTGAAACCGCGAGTTTTTAGCCAATCTCAAAAAAGATAGTCTCAGT 1138
AF176319  CTATTACAAAGAGTAGCTGAAACCGCGAGTTTTTAGCCAATCTCAAAAAAGTATAGTCTCAGT 1138
** *****

spaCB      TCGGATTGAAGTCTGCAACTCGACTTCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAG 1193
X92869    TCGGATTGAAGTCTGCAACTCGACTTCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAG 1192
spaSA     TCGGATTGAAGTCTGCAACTCGACTTCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAG 1192
spaMS     ACGGATTGAAGTCTGCAACTCGACTTCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAG 1198
AF176319  ACGGATTGAAGTCTGCAACTCGACTTCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAG 1198
*****

spaCB      CATGTCGTGGTGAATACGTTCTCGGGGTTTGTACACACCGCCCGTCA 1240
X92869    CATGTCGTGGTGAATACGTTCTCGGGGTTTGTACACACCGCCCGTCA 1241
spaSA     CATGTCGTGGTGAATACGTTCTCGGGGTTTGTACACACCGCCCGTCA 1239
spaMS     CATGTCGCGGTGAATACGTTCTCGGGGTTTGTACACACCGCCCGTCA 1245
AF176319  CATGTCGCGGTGAATACGTTCTCGGGGTTTGTACACACCGCCCGTCA 1245
*****

```

**CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment**  
**Opuntiae Aus e ops vs type AJ293216**  
**In verde sito restrizione GATC (Sau3)**  
**In rosso sito restrizione GANTC (HinfI)**  
**In azzurro sito restrizione TCGA (TaqI)**

```

aus      ---ATTACTGCTAAGACTGGATAGGAAGAAATAAGGCATCTTATTTCTTTTAAAAGACCT 57
AJ293216 GAAACAGTGGCTAAGACTGGATAGGAAGAAATAAGGCATCTTATTTCTTTTAAAAGACCT 60
ops      ---ACGACTGCTAAGACTGGATAGGAAGAAATAAGGCATCTTATTTCTTTTAAAAGACCT 57
          *      *****

aus      AGTAATAGGTATACTTTAGGAGGGGCTTGC GCCATATTAGTTAGTTGGTAGGGTAATGGC 117
AJ293216 AGTAATAGGTATACTTTAGGAGGGGCTTGC GCCATATTAGTTAGTTGGTAGGGTAATGGC 120
ops      AGTAATAGGTATACTTTAGGAGGGGCTTGC GCCATATTAGTTAGTTGGTAGGGCAATGGC 117
          *****

aus      CTACCAAGACGATGATGTGTAGCTGGACTGAGAGGTTGAACAGCCACATTGGGACTGAGA 177
AJ293216 CTACCAAGACGATGATGTGTAGCTGGACTGAGAGGTTGAACAGCCACATTGGGACTGAGA 180
ops      CTACCAAGACGATGATGTGTAGCTGGACTGAGAGGTTGAACAGCCACATTGGGACTGAGA 177
          *****

aus      CACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAATTTTCGGCAATGGAGGAAACTCT 237
AJ293216 CACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAATTTTCGGCAATGGAGGAAACTCT 240
ops      CACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAATTTTCGGCAATGGAGGAAACTCT 237
          *****

aus      GACCGAACACGCCCGGTGAACGACGAAGTACTTTGGTATGTAAGTTCTTTTATCAAGG 297
AJ293216 GACCGAGCAACGCCCGGTGAACGACGAAGTACTTTGGTATGTAAGTTCTTTTATCAAGG 300
ops      GACCGAGCAACGCCCGGTGAACGACGAAGTACTTTGGTATGTAAGTTCTTTTATCAAGG 297
          *****

aus      AAGAAAAGCAAGTGGCGAACCATTGTGTTGCCGGTACTTGATGAATAAGCCCCGGCTAAT 357
AJ293216 AAGAAAAGCAAGTGGCGAACCATTGTGTTGCCGGTACTTGATGAATAAGCCCCGGCTAAT 360
ops      AAGAAAAGCAAGTGGCGAACCATTGTGTTGCCGGTACTTGATGAATAAGCCCCGGCTAAT 357
          *****

aus      TATGTGCCAGCAGCCCGGTAAGACATAAGGGGCAAGTGTATCCGGAATTATTGGGCGT 417
AJ293216 TATGTGCCAGCAGCCCGGTAAGACATAAGGGGCAAGTGTATCCGGAATTATTGGGCGT 420
ops      TATGTGCCAGCAGCCCGGTAAGACATAAGGGGCAAGTGTATCCGGAATTATTGGGCGT 417
          *****

aus      AAAGGGTGCGTAGGCGGTCTAGTAAGTCAGTGGTGTAATGGCAACGCTCAACGTTGTCCG 477
AJ293216 AAAGGGTGCGTAGGCGGTCTAGTAAGTCAGTGGTGTAATGGCAACGCTCAACGTTGTCCG 480
ops      AAAGGGTGCGTAGGCGGTCTAGTAAGTCAGTGGTGCAATGGCAACGCTCAACGTTGTCCG 477
          *****

aus      GCTATTGAACTGCTAAACTTGAGTTAGATAGAGGCGAGTGAATTCATGTGTAGCGGT 537
AJ293216 GCTATTGAACTGCTAAACTTGAGTTAGATAGAGGCGAGTGAATTCATGTGTAGCGGT 540
ops      GCTATTGAACTGCTAAACTTGAGTTAGATAGAGGCGAGTGAATTCATGTGTAGCGGT 537
          *****

aus      AAAATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAGAGGCGTAGGCGGCTCGCTGGGTCTTAAC TG 597
AJ293216 AAAATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAGAGGCGTAGGCGGCTCGCTGGGTCTTAAC TG 600
ops      AAAATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAGAGGCGTAGGCGGCTCGCTGGGTCTTAAC TG 597
          *****

aus      ACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGACCACGCCG 657
AJ293216 ACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGACCACGCCG 660
ops      ACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGACCACGCCG 657
          *****

aus      TAAACGATGAGTACTAAGTGTCTGGGTTAAACCGGTACTGAAGTTAACACATTAAGTACTC 717
AJ293216 TAAACGATGAGTACTAAGTGTCTGGGTTAAACCGGTACTGAAGTTAACACATTAAGTACTC 720
ops      TAAACGATGAGTACTAAGTGTCTGGGTTAAACCGGTACTGAAGTTAACACATTAAGTACTC 717
          *****

aus      CGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAG 777
AJ293216 CGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAG 780
ops      CGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAG 777
          *****

aus      CGGTGATCATGTGTTTAAATTCGAAGATACCCGAAAAACCTTACCAGGTCTTGACATGC 837
AJ293216 CGGTGATCATGTGTTTAAATTCGAAGATACCCGAAAAACCTTACCAGGTCTTGACATGC 840
ops      CGGTGATCATGTGTTTAAATTCGAAGATACCCGAAAAACCTTACCAGGTCTTGACATGC 837
          *****

```

```
aus          TTTTGCGAAACGGTAGTAATATCGTAGAGGTTATCAGAAACACAGGTGGTGCATGGTTGT 897
AJ293216    TTTTGCGAAACGGTAGTAATATCGTAGAGGTTATCAGAAACACAGGTGGTGCATGGTTGT 900
ops         TTTTGCGAAACGGTAGTAATATCGTAGAGGTTATCAGAAACACAGGTGGTGCATGGTTGT 897
*****

aus          CGTCAGCTCGTGTGCGTGAGATGTTAGGTTAAGTCTAAAACGAGCGAAACCCTTATCGTT 957
AJ293216    CGTCAGCTCGTGTGCGTGAGATGTTAGGTTAAGTCTAAAACGAGCGAAACCCTTATCGTT 960
ops         CGTCAGCTCGTGTGCGTGAGATGTTAGGTTAAGTCTAAAACGAGCGAAACCCTTATCGTT 957
*****

aus          AGTTGCCAGCACGTTATGGTGGGGACTTTAACGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAG 1017
AJ293216    AGTTGCCAGCACGTTATGGTGGGGACTTTAACGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAG 1020
ops         AGTTGCCAGCACGTTATGGTGGGGACTTTAACGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAG 1017
*****

aus          GTGAGGATCAGTCAAATCAGCATGCCCTTATGACCTGGGCTACAAACGTGATACAATG 1077
AJ293216    GTGAGGATCAGTCAAATCAGCATGCCCTTATGACCTGGGCTACAAACGTGATACAATG 1080
ops         GTGAGGATCAGTCAAATCAGCATGCCCTTATGACCTGGGCTACAAACGTGATACAATG 1077
*****

aus          GCTGTTACAAAGGGTAGCTGAAACGTAAGTTCTTGCCCAATCCCCAAAAACAGTCTCAGT 1137
AJ293216    GCTGTTACAAAGGGTAGCTGAAACGTAAGTTCTTGCCCAATCCCCAAAAACAGTCTCAGT 1140
ops         GCTGTTACAAAGGGTAGCTGAAACGTAAGTTCTTGCCCAATCCCCAAAAACAGTCTCAGT 1137
*****

aus          CCGGATTGAAGTCTGCAACCCGACTTCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAG 1197
AJ293216    CCGGATTGAAGTCTGCAACTCGACTTCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAG 1200
ops         CCGGATTGAAGTCTGCAACTCGACTTCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAG 1197
*****

aus          CATGTCGCGGTGAATACGTTCTCGGGGTTGTACACACCGCCCGTCA 1244
AJ293216    CATGTCGCGGTGAATACGTTCTCGGGGTTGTACACACCGCCCGTCA 1247
ops         CATGTCGCGGTGAATACGTTCTCGGGGTTGTACACACCGCCCGTCA 1244
*****
```

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment  
 Opf vs type EU099551  
 In rosso GANTC (HinfI)

```

opf -----ACGAC 5
EU099551 AACGGGTGAGTAACACGTAAGCAACCTACCTAAAGACGAGGATAACCATTGGAAACAGT 120
                                                **

opf TGCTAAGACTGGATAGGAAGAAATAAGGCATCTTATTTCTTTTAAAAGACCTAGTAATAG 65
EU099551 GGCTAAGACTGGATAGGAAGAAATAAGGCATCTTATTTCTTTTAAAAGACCTAGTAATAG 180
          *****

opf GTATACTTTAGGAGGGGCTTGCGCCATATTAGTTAGTTGGTAGGGTAATGGCCTACCAAG 125
EU099551 GTATACTTTAGGAGGGGCTTGCGCCATATTAGTTAGTTGGTAGGGTAATGGCCTACCGAG 240
          *****

opf ACGATGATGTGTAGCTGGACTGAGAGGTTGAACAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCC 185
EU099551 ACGATGATGTGTAGCTGGACTGAGAGGTTGAACAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCC 300
          *****

opf AAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAATTTTCGGCAATGGAGGAACTCTGACCGAGC 245
EU099551 AAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAATTTTCGGCAATGGAGGAACTCTGACCGAGC 360
          *****

opf AACGCCGCGTGAACGACGAAGTACTTTGGTATGTAAAGTTCTTTTATCAAGGAAGAAAAG 305
EU099551 AACGCCGCGTGAACGACGAAGTACTTTGGTATGTAAAGTTCTTTTATCAAGGAAGAAAAG 420
          *****

opf CAAGTGGCGAACCATTTGTTGCGCGTACTTGATGAATAAGCCCCGGCTAATTATGTGCC 365
EU099551 CAAGTGGCGAACCATTTGTTGCGCGTACTTGATGAATAAGCCCCGGCTAATTATGTGCC 480
          *****

opf AGCAGCCGCGGTAAAGACATAAGGGGCAAGTGTATCCGGAATTATGGGCGTAAAGGGTG 425
EU099551 AGCAGCCGCGGTAAAGACATAAGGGGCAAGTGTATCCGGAATTATGGGCGTAAAGGGTG 540
          *****

opf CGTAGGCGGTCTAGTAAGTCAGTGGTGTAAATGGCAACGCTCAACGTTGTCCGGCTATTGA 485
EU099551 CGTAGGCGGTCTAGTAAGTCAGTGGTGTAAATGGCAACGCTCAACGTTGTCCGGCTATTGA 600
          *****

opf AACTGCTAAACTTGAGTTAGATAGAGGCGAGTGAATTCATGTGTAGCGGTAAAATGCG 545
EU099551 AACTGCTAAACTTGAGTTAGATAGAGGCGAGTGAATTCATGTGTAGCGGTAAAATGCG 660
          *****

opf TAAATATATGGAGGAACACCAGAGGCGTAGGCGGCTCGCTGGGTCTTAACTGACGCTGAG 605
EU099551 TAAATATATGGAGGAACACCAGAGGCGTAGGCGGCTCGCTGGGTCTTAACTGACGCTGAG 720
          *****

opf GCACGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGTAAACGAT 665
EU099551 GCACGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGTAAACGAT 780
          *****

opf GAGTACTAAGTGTGGGTTAAACCGGCTACTGAAGTTAACACATTAAGTACTCCGCTGAG 725
EU099551 GAGTACTAAGTGTGGGTTAAACCGGCTACTGAAGTTAACACATTAAGTACTCCGCTGAG 840
          *****

opf TAGTACGTACGCAAGTATGAAACTTAAAGGAATTGACGCGACTCGCACAAGCGGTGGAT 785
EU099551 TAGTACGTACGCAAGTATGAAACTTAAAGGAATTGACGCGACTCGCACAAGCGGTGGAT 900
          *****

opf CATGTTGTTTAAATTCGAAGATACCCGAAAACCTTACCGGCTCTTGACATGTTTTTGCGA 845
EU099551 CATGTTGTTTAAATTCGAAGATACCCGAAAACCTTACCGGCTCTTGACATGTTTTTGCGA 960
          *****

opf AACGGTAGTAATATCGTAGAGGTTATCAGAAACACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCT 905
EU099551 AACGGTAGTAATATCGTAGAGGTTATCAGAAACACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCT 1020
          *****

opf CGTGTGCGTGAGATGTTAGGTTAAGTCCATAAACGAGCGAAACCCCTTATCGTTAGTTGCCA 965
EU099551 CGTGTGCGTGAGATGTTAGGTTAAGTCCATAAACGAGCGAAACCCCTTATCGTTAGTTGCCA 1080
          *****

opf GCACGTTATGGTGGGACTTTAACGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGAGGAT 1025
EU099551 GCACGTTATGGTGGGACTTTAACGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGAGGAT 1140
          *****
  
```

```
opf          CACGTCAAATCAGCATGCCCTTATGACCTGGGCTACAAACGTGATACAATGGCTGTTAC 1085
EU099551    CACGTCAAATCAGCATGCCCTTATGACCTGGGCTACAAACGTGATACAATGGCTGTTAC 1200
*****

opf          AAAGGGTAGCTGAAACGTAAGTTCTTGGCCAATCCCCAAAAACAGTCTCAGTCCGGATTG 1145
EU099551    AAAGGGTAGCTGAAACGTAAGTTCTTGGCCAATCCCCAAAAACAGTCTCAGTCCGGATTG 1260
*****

opf          AAGTCTGCAACTCGACTTCATGAAGTTG SAATC GCTAGTAATCGC GAATC AGCATGTTCGC 1205
EU099551    AAGTCTGCAACTC SACTC CATGAAGTTG SAATC GCTAGTAATCGC GAATC AGCATGTTCGC 1320
*****

opf          GGTGAATACGTTCTCAGGGTTTGTACACACCGCCCGTCA----- 1244
EU099551    GGTGAATACGTTCTCAGGGTTTGTACACACCGCCCGTCAAAACCAGAAAGTTGGCAATAC 1380
*****
```

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment  
NC\_005303 vs Rumex MR1, MR2, SN1, SN2, MA  
In rosso sito restrizione AGCT (AluI)

```
MR1 -----ACGACTGCTAAGACTGGATAGGAGACAA 28
SN2 -----ACGACTGCTAAGACTGGATAGGAGACAA 28
SN1 -----ACGACTGCTAAGACTGGATAGGAGACAA 28
NC_005303 ATCTGCCCTAAGACGAGGATAACAGTTGGAACGACTGCTAAGACTGGATAGGAGACAA 180
MA -----ACGACTGCTAAGACTGGATAGGAGACAA 28
MR2 -----ACGACTGCTAAGACTGGATAGGAGACAA 28
*****

MR1 GAGGGCATCTTCTGTTTTTAAAAGACCTAGCAATAGGTATGCTTAGGGAGGAGCTTGGC 88
SN2 GAGGGCATCTTCTGTTTTTAAAAGACCTAGCAATAGGTATGCTTAGGGAGGAGCTTGGC 88
SN1 GAGGGCATCTTCTGTTTTTAAAAGACCTAGCAATAGGTATGCTTAGGGAGGAGCTTGGC 88
NC_005303 GAGGGCATCTTCTGTTTTTAAAAGACCTAGCAATAGGTATGCTTAGGGAGGAGCTTGGC 240
MA GAAGGCATCTTCTTATTTTTAAAAGACCTAGCAATAGGTATGCTTAGGGAGGAGCTTGGC 88
MR2 GAAGGCATCTTCTGTTTTTAAAAGACCTAGCAATAGGTATGCTTAGGGAGGAGCTTGGC 88
** *****

MR1 TCACATTAGTTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCAACAAGACTATGATGTGTAGCCGGGCTGA 148
SN2 TCACATTAGTTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCAACAAGACTATGATGTGTAGCCGGGCTGA 148
SN1 TCACATTAGTTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCAACAAGACTATGATGTGTAGCCGGGCTGA 148
NC_005303 TCACATTAGTTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCAACAAGACTATGATGTGTAGCCGGGCTGA 300
MA TCACATTAGTTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCAACAAGACTATGATGTGTAGCCGGGCTGA 148
MR2 TCACATTAGTTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCAACAAGACTATGATGTGTAGCCGGGCTGA 148
*****

MR1 GAGGTTGAACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGT 208
SN2 GAGGTTGAACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGT 208
SN1 GAGGTTGAACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGT 208
NC_005303 GAGGTTGAACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGT 360
MA GAGGTTGAACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGT 208
MR2 GAGGTTGAACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGT 208
*****

MR1 AGGGAATTTTCGGCAATGGAGGAAACTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGTA 268
SN2 AGGGAATTTTCGGCAATGGAGGAAACTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGTA 268
SN1 AGGGAATTTTCGGCAATGGAGGAAACTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGTA 268
NC_005303 AGGGAATTTTCGGCAATGGAGGAAACTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGTA 420
MA AGGGAATTTTCGGCAATGGAGGAAACTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGTA 268
MR2 AGGGAATTTTCGGCAATGGAGGAAACTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGTA 268
*****

MR1 TTTCGGTACGTAAAGTTCCTTTTATAGGGAAGAATAAATGATGGAAAAATCATTCTGACG 328
SN2 TTTCGGTACGTAAAGTTCCTTTTATAGGGAAGAATAAATGATGGAAAAATCATTCTGACG 328
SN1 TTTCGGTACGTAAAGTTCCTTTTATAGGGAAGAATAAATGATGGAAAAATCATTCTGACG 328
NC_005303 TTTCGGTACGTAAAGTTCCTTTTATAGGGAAGAATAAATGATGGAAAAATCATTCTGACG 480
MA TTTCGGTACGTAAAGTTCCTTTTATAGGGAAGAATAAATGATGGAAAAATCATTCTGACG 328
MR2 TTTCGGTACGTAAAGTTCCTTTTATAGGGAAGAATAAATGATGGAAAAATCATTCTGACG 328
*****

MR1 GTACCTAATGAATAAGCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGGGGG 388
SN2 GTACCTAATGAATAAGCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGGGGG 388
SN1 GTACCTAATGAATAAGCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGGGGG 388
NC_005303 GTACCTAATGAATAAGCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGGGGG 540
MA GTACCTAATGAATAAGCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGGGGG 388
MR2 GTACCTAATGAATAAGCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGGGGG 388
*****

MR1 CAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCCTAGGCGGTTAAATAAGTTTATGG 448
SN2 CAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCCTAGGCGGTTAAATAAGTTTATGG 448
SN1 CAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCCTAGGCGGTTAAATAAGTTTATGG 448
NC_005303 CAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCCTAGGCGGTTAAATAAGTTTATGG 600
MA CAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCCTAGGCGGTTAAATAAGTTTATGG 448
MR2 CAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCCTAGGCGGTTAAATAAGTTTATGG 448
*****

MR1 TCTAAGTGCAATGCTCAACATTGTGATGCTATAAAAACTGTTTAGCTAGAGTAAGATAGA 508
SN2 TCTAAGTGCAATGCTCAACATTGTGATGCTATAAAAACTGTTTAGCTAGAGTAAGATAGA 508
SN1 TCTAAGTGCAATGCTCAACATTGTGATGCTATAAAAACTGTTTAGCTAGAGTAAGATAGA 508
NC_005303 TCTAAGTGCAATGCTCAACATTGTGATGCTATAAAAACTGTTTAGCTAGAGTAAGATAGA 660
MA TCTAAGTGCAATGCTCAACATTGTGATGCTATAAAAACTGTTTAGCTAGAGTAAGATAGA 508
MR2 TCTAAGTGCAATGCTCAACATTGTGATGCTATAAAAACTGTTTAGCTAGAGTAAGATAGA 508
*****
```

MR1 GGCAAGTGAATTCATGTGTAGTGGTAAAATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAGTAG 568  
SN2 GGCAAGTGAATTCATGTGTAGTGGTAAAATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAGTAG 568  
SN1 GGCAAGTGAATTCATGTGTAGTGGTAAAATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAGTAG 568  
NC\_005303 GGCAAGTGAATTCATGTGTAGTGGTAAAATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAGTAG 720  
MA GGCAAGTGAATTCATGTGTAGTGGTAAAATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAGTAG 568  
MR2 GGCAAGTGAATTCATGTGTAGTGGTAAAATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAGTAG 568  
\*\*\*\*\*

MR1 CGAAGGCGGCTTGCTGGGTCTTTACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAG 628  
SN2 CGAAGGCGGCTTGCTGGGTCTTTACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAG 628  
SN1 CGAAGGCGGCTTGCTGGGTCTTTACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAG 628  
NC\_005303 CGAAGGCGGCTTGCTGGGTCTTTACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAG 780  
MA CGAAGGCGGCTTGCTGGGTCTTTACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAG 628  
MR2 CGAAGGCGGCTTGCTGGGTCTTTACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAG 628  
\*\*\*\*\*

MR1 GATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTACTAAACGTTGGGTAAAACCA 688  
SN2 GATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTACTAAACGTTGGGTAAAACCA 688  
SN1 GATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTACTAAACGTTGGGTAAAACCA 688  
NC\_005303 GATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTACTAAACGTTGGGTAAAACCA 840  
MA GATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTACTAAACGTTGGGTAAAACCA 688  
MR2 AATTAGATACCCTGTTATTCACGCCGTAACGAGGAGTACTAAACGTTGGGTAAAACCA 688  
\*\*\*\*\*

MR1 GTGTTGAAGTTAACACATTAAGTACTCCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTT 748  
SN2 GTGTTGAAGTTAACACATTAAGTACTCCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTT 748  
SN1 GTGTTGAAGTTAACACATTAAGTACTCCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTT 748  
NC\_005303 GTGTTGAAGTTAACACATTAAGTACTCCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTT 900  
MA GTGTTGAAGTTAACACATTAAGTACTCCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTT 748  
MR2 GTGTTGAAGTTAACACATTAAGTACTCCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTT 748  
\*\*\*\*\*

MR1 AAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTAATTCGAAGGTACCC 808  
SN2 AAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTAATTCGAAGGTACCC 808  
SN1 AAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTAATTCGAAGGTACCC 808  
NC\_005303 AAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTAATTCGAAGGTACCC 960  
MA AAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTAATTCGAAGGTACCC 808  
MR2 AAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTAATTCGAAGGTACCC 808  
\*\*\*\*\*

MR1 GAAAAACCTCACCAGGTCTTGACATGCTTCTGCAAAGCTGTAGAAACACAGTGGAGGTTA 868  
SN2 GAAAAACCTCACCAGGTCTTGACATGCTTCTGCAAAGCTGTAGAAACACAGTGGAGGTTA 868  
SN1 GAAAAACCTCACCAGGTCTTGACATGCTTCTGCAAAGCTGTAGAAACACAGTGGAGGTTA 868  
NC\_005303 GAAAAACCTCACCAGGTCTTGACATGCTTCTGCAAAGCTGTAGAAACACAGTGGAGGTTA 1020  
MA GAAAAACCTCACCAGGTCTTGACATGCTTCTGCAAAGCTGTAGAAACACAGTGGAGGTTA 868  
MR2 GAAAAACCTCACCAGGTCTTGACATGCTTCTGCAAAGCTGTAGAAACACAGTGGAGGTTA 868  
\*\*\*\*\*

MR1 TCAGTTGCACAGGTGGTGCATGGTGTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGAGATGTTGGGTTAAGT 928  
SN2 TCAGTTGCACAGGTGGTGCATGGTGTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGAGATGTTGGGTTAAGT 928  
SN1 TCAGTTGCACAGGTGGTGCATGGTGTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGAGATGTTGGGTTAAGT 928  
NC\_005303 TCAGTTGCACAGGTGGTGCATGGTGTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGAGATGTTGGGTTAAGT 1080  
MA TCAGTTGCACAGGTGGTGCATGGTGTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGAGATGTTGGGTTAAGT 928  
MR2 TCAGTTGCACAGGTGGTGCATGGTGTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGAGATGTTGGGTTAAGT 928  
\*\*\*\*\*

MR1 CCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTACCAGCACGTAATGGTGGGGACTTTAGCA 988  
SN2 CCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTACCAGCACGTAATGGTGGGGACTTTAGCA 988  
SN1 CCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTACCAGCACGTAATGGTGGGGACTTTAGCA 988  
NC\_005303 CCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTACCAGCACGTAATGGTGGGGACTTTAGCA 1140  
MA CCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTACCAGCACGTAATGGTGGGGACTTTAGCA 988  
MR2 CCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTACCAGCACGTAATGGTGGGGACTTTAGCA 988  
\*\*\*\*\*

MR1 AGACTGCCAGTGATAAATGGAGGAAGTGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCTTAT 1048  
SN2 AGACTGCCAGTGATAAATGGAGGAAGTGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCTTAT 1048  
SN1 AGACTGCCAGTGATAAATGGAGGAAGTGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCTTAT 1048  
NC\_005303 AGACTGCCAGTGATAAATGGAGGAAGTGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCTTAT 1200  
MA AGACTGCCAGTGATAAATGGAGGAAGTGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCTTAT 1048  
MR2 AGACTGCCAGTGATAAATGGAGGAAGTGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCTTAT 1048  
\*\*\*\*\*

MR1 GACCTGGGCTACAACCGTGATACAATGGCTGTTACAAAGGGTAGCTGAAGCGCAAGTTTT 1108  
SN2 GACCTGGGCTACAACCGTGATACAATGGCTGTTACAAAGGGTAGCTGAAGCGCAAGTTTT 1108  
SN1 GACCTGGGCTACAACCGTGATACAATGGCTGTTACAAAGGGTAGCTGAAGCGCAAGTTTT 1108  
NC\_005303 GACCTGGGCTACAACCGTGATACAATGGCTGTTACAAAGGGTAGCTGAAGCGCAAGTTTT 1260  
MA GACCTGGGCTACAACCGTGATACAATGGCTGTTACAAAGGGTAGCTGAAGCGCAAGTTTT 1108  
MR2 GACCTGGGCTACAACCGTGATACAATGGCTGTTACAAAGGGTAGCTGAAGCGCAAGTTTT 1108  
\*\*\*\*\*

MR1 TGGCGAATCTCAAAAAAACAGTCTCAGTTCGGATTGAAGTCTGCAACTCGACTTCATGAA 1168  
SN2 TGGCGAATCTCAAAAAAACAGTCTCAGTTCGGATTGAAGTCTGCAACTCGACTTCATGAA 1168  
SN1 TGGCGAATCTCAAAAAAACAGTCTCAGTTCGGATTGAAGTCTGCAACTCGACTTCATGAA 1168  
NC\_005303 TGGCGAATCTCAAAAAAACAGTCTCAGTTCGGATTGAAGTCTGCAACTCGACTTCATGAA 1320  
MA TGGCGAATCTCAAAAAAACAGTCTCAGTTCGGATTGAAGTCTGCAACTCGACTTCATGAA 1168  
MR2 TGGCGAATCTCAAAAAAACAGTCTCAGTTCGGATTGAAGTCTGCAACTCGACTTCATGAA 1168  
\*\*\*\*\*

MR1 GTTGGAAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTTCTCGGGGTTTGT 1228  
SN2 GTTGGAAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTTCTCGGGGTTTGT 1228  
SN1 GTTGGAAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTTCTCGGGGTTTGT 1228  
NC\_005303 GTTGGAAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTTCTCGGGGTTTGT 1380  
MA GTTGGAAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTTCTCGGGGTTTGT 1228  
MR2 GTTGGAAATCGCTAGTAGTCGCGAATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTTCTCGGGGTTTGT 1228  
\*\*\*\*\*

MR1 ACACACCGCCCGTCA 1243  
SN2 ACACACCGCCCGTCA 1243  
SN1 ACACACCGCCCGTCA 1243  
NC\_005303 ACACACCGCCCGTCA 1395  
MA ACACACCGCCCGTCA 1243  
MR2 ACACACCGCCCGTCA 1243  
\*\*\*\*\*

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment  
 Spartium CB ed SA vs type sequence X92869  
 In verde il sito di restrizione AGCT (AluI)  
 In rosso il sito di restrizione CGCG (BstUI)

```

X92869      CGAGGATAACAGTTGGAACGACTGCTAAGACTGGATAGGAAGTTTAAAGGCATCTTGAA 180
spa3-CB    -----ACGACTGCTAAGACTGGATAGGAAGTTTAAAGGCATCTTGAA 42
spa1-SA    -----ACGACTGCTAAGACTGGATAGGAAGTTTAAAGGCATCTTGAA 42
            *****

X92869      ACTTTTAAAAGACCTGAAAGGGTATGCTGAGAGATGAGCTTGC GGCCACATTAGTTAGTTG 240
spa3-CB    ACTTTTAAAAGACCTGAAAGGGTATGCTGAGAGATGAGCTTGC GGCCACATTAGTTAGTTG 102
spa1-SA    GCTTTTAAAAGACCTGAAAGGGTATGCTGAGAGATGAGCTTGC GGCCACATTAGTTAGTTG 102
            *****

X92869      GTAAGGTAAAGGCTTACCAAGACTATGATGTGTAGCTGGACTGAGAGGTTGAACGGCCAC 300
spa3-CB    GTAAGGTAAAGGCTTACCAAGACTATGATGTGTAGCTGGACTGAGAGGTTGAACGGCCAC 162
spa1-SA    GTAAGGTAAAGGCTTACCAAGACTATGATGTGTAGCTGGACTGAGAGGTTGAACGGCCAC 162
            *****

X92869      ATTGGGACTGAGATACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAATTTTCGGCAA 360
spa3-CB    ATTGGGACTGAGATACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAATTTTCGGCAA 222
spa1-SA    ATTGGGACTGAGATACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAATTTTCGGCAA 222
            *****

X92869      TGGAGGAAACTCTGACCGAGCAACGCGCGCTGAACGATGAAGTATTTCCGGTATGTAAAGT 420
spa3-CB    TGGAGGAAACTCTGACCGAGCAACGCGCGCTGAACGATGAAGTATTTCCGGTATGTAAAGT 282
spa1-SA    TGGAGGAAACTCTGACCGAGCAACGCGCGCTGAACGATGAAGTATTTCCGGTATGTAAAGT 282
            *****

X92869      TCTTTTATTAAGAAGAAAAAATGGTGGAAAAATCATTCTGACGGTATTTAATGAATAAG 480
spa3-CB    TCTTTTATTAAGAAGAAAAAATGGTGGAAAAATCATTCTGACGGTATTTAATGAATAAG 342
spa1-SA    TCTTTTATTAAGAAGAAAAAATGGTGGAAAAATCATTCTGACGGTATTTAATGAATAAG 342
            *****

X92869      CCCC GGCTAACTATGTGCCAGCAGCTGCGGTAATACATAGGGGGCAAGCGTTATCCGGAT 540
spa3-CB    CCCC GGCTAACTATGTGCCAGCAGCTGCGGTAATACATAGGGGGCAAGCGTTATCCGGAT 402
spa1-SA    CCCC GGCTAACTATGTGCCAGCAGCTGCGGTAATACATAGGGGGCAAGCGTTATCCGGAT 402
            *****

X92869      TTATTGGGCGTAAAGGGTGTGTAGGCGGTTTAATAAGTCTATGGTGTAAGTGCAACGCTC 600
spa3-CB    TTATTGGGCGTAAAGGGTGTGTAGGCGGTTTAATAAGTCTATGGTGTAAGTGCAACGCTC 462
spa1-SA    TTATTGGGCGTAAAGGGTGTGTAGGCGGTTTAATAAGTCTATGGTGTAAGTGCAACGCTC 462
            *****

X92869      AACGTTGTGAAGCTATAGAACTGTTAGACTTGAGTTGGATAGAGGCAAGTGGAATTCCA 660
spa3-CB    AACGTTGTGAAGCTATAGAACTGTTAGACTTGAGTTGGATAGAGGCAAGTGGAATTCCA 522
spa1-SA    AACGTTGTGAAGCTATAGAACTGTTAGACTTGAGTTGGATAGAGGCAAGTGGAATTCCA 522
            *****

X92869      TGTGTAGCGGTAAAATGCGTAAAGATATGGAGGAACACCAGTAGCGAAGGCGGCTTGCTG 720
spa3-CB    TGTGTAGCGGTAAAATGCGTAAAGATATGGAGGAACACCAGTAGCGAAGGCGGCTTGCTG 582
spa1-SA    TGTGTAGCGGTAAAATGCGTAAAGATATGGAGGAACACCAGTAGCGAAGGCGGCTTGCTG 582
            *****

X92869      GGTCTTAACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGT 780
spa3-CB    GGTCTTAACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGT 642
spa1-SA    GGTCTTAACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGT 642
            *****

X92869      AGTCCACGCCGTAACGATGAGTACTAAGTGTGGGTTAAACCAGTGC TGAAGTTAACAC 840
spa3-CB    AGTCCACGCCGTAACGATGAGTACTAAGTGTGGGTTAAACCAGTGC TGAAGTTAACAC 702
spa1-SA    AGTCCACGCCGTAACGATGAGTACTAAGTGTGGGTTAAACCAGTGC TGAAGTTAACAC 702
            *****

X92869      ATTAAGTACTCCGCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTTAAAGGAATTGACGGGA 900
spa3-CB    ATTAAGTACTCCGCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTTAAAGGAATTGACGGGA 762
spa1-SA    ATTAAGTACTCCGCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTTAAAGGAATTGACGGGA 762
            *****

X92869      CTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTAATTCGAAGATA CGCGAAAAACCTTACCAGG 960
spa3-CB    CTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTAATTCGAAGATA CGCGAAAAACCTTACCAGG 822
spa1-SA    CTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTAATTCGAAGATA CGCGAAAAACCTTACCAGG 822
            *****

```

```

X92869      TCTTGACATAACGTGGCAAAGCTATTGAAAGATAGTGGAGGTTATC CGCGTTACAGGTGG 1020
spa3-CB     TCTTGACATAACGTGGCAAAGCTATTGAAAGATAGTGGAGGTTATCCACGTTACAGGTGG 882
spa1-SA     TCTTGACATAACGTGGCAAAGCTATTGAAAGATAGTGGAGGTTATC CGCGTTACAGGTGG 882
*****

X92869      TGCATGG-TTGTGCTCAGCTCGTGTGCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCACAACGAGCGCA 1079
spa3-CB     TGCATGGGTTGTGCTCAGCTCGTGTGCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCACAACGAGCGCA 942
spa1-SA     TGCATGG-TTGTGCTCAGCTCGTGTGCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCACAACGAGCGCA 941
*****

X92869      ACCCTTATTGCTAGTTACCATCATTTAGTTGGGCACTTTAGTGAGACTGCCAATGATAAA 1139
spa3-CB     ACCCTTATTGCTAGTTACCATCATTTAGTTGGGCACTTTAGTGAGACTGCCAATGATAAA 1002
spa1-SA     ACCCTTATTGCTAGTTACCATCATTTAGTTGGGCACTTTAGTGAGACTGCCAATGATAAA 1001
*****

X92869      TTGGAGGAAGGTGGGGATTACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACAAACG 1199
spa3-CB     TTGGAGGAAGGTGGGGATTACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACAAACG 1062
spa1-SA     TTGGAGGAAGGTGGGGATTACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACAAACG 1061
*****

X92869      TGATACAATGGCTGTTACAAAGAGTAGCTGAAACGTGAGTTCTTAGCCAATCTCAAAAAA 1259
spa3-CB     TGATACAATGGCTGTTACAAAGAGTAGCTGAAACGTGAGTTCTTAGCCAATCTCAAAAAA 1122
spa1-SA     TGATACAATGGCTGTTACAAAGAGTAGCTGAAACGCGAGTTCTTAGCCAATCTCAAAAAA 1121
*****

X92869      ACAGTCTCAGTTCGGATTGAAGTCTGCAACTCGACTTCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAA 1319
spa3-CB     ACAGTCTCAGTTCGGATTGAAGTCTGCAACTCGACTTCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAA 1182
spa1-SA     ACAGTCTCAGTTCGGATTGAAGTCTGCAACTCGACTTCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAA 1181
*****

X92869      TCGCGAATCAGCATGTCGTGGTGAATACGTTCTCGGGGTTTGTACACACCGCCCGTCAA 1379
spa3-CB     TCGCGAATCAGCATGTCGTGGTGAATACGTTCTCGGGGTTTGTACACACCGCCCGTCA-- 1240
spa1-SA     TCGCGAATCAGCATGTCGTGGTGAATACGTTCTCGGGGTTTGTACACACCGCCCGTCA-- 1239
*****

```