

Coltivare i fitoplasmi su substrati artificiali

Applicazioni pratiche e ricerca

Christian Cainelli
Fondazione Edmund Mach

Chi tra gli agricoltori trentini non ha mai sentito parlare di scopazzi del melo, flavescenza dorata o legno nero? Non tutti sanno però che queste note malattie sono causate da tre distinti patogeni appartenenti tutti allo stesso gruppo: i fitoplasmi.

Questi sono microrganismi unicellulari, molto simili ai micoplasmi, patogeni per l'uomo e gli animali. I fitoplasmi, invece, colpiscono centinaia di specie di piante, presenti in tutti i continenti, dalle zone a clima temperato-caldo fino a quelle tropicali. Infettano sia piante arboree che erbacee.

Dal punto di vista economico, in Europa è rilevante la loro infezione su vite, su pomacee, come melo e pero, e su drupacee, come pesco, albicocco e ciliegio. Le piante erbacee infettate, pur non causando generalmente danni economici, hanno un ruolo importante nella diffusione delle malattie in quanto fungono da serbatoio di fitoplasmi.

Questi patogeni sono tra le più piccole cellule capaci di vita autonoma, con un diametro inferiore a un millesimo di millimetro. Analogamente ai batteri, sono delimitati da una membrana cellulare ma presentano la caratteristica peculiare di non avere una parete rigida. Di conseguenza essi sono pleomorfi, cioè non hanno una forma stabile e definita.

All'interno delle piante, i fitoplasmi si sviluppano quasi esclusivamente nelle cellule del floema e tendono a distribuirsi, in modo più o meno uniforme, in tutti gli organi, comprese le radici.

In natura sono trasmessi da organismi vettori, come le cicaline, o le psille, insetti dotati di apparato boccale pungente succhiante in grado di arrivare a nutrirsi del floema nel quale si trovano i fitoplasmi. Questi, se trovano un ambiente ideale all'interno dell'ospite vettore, si moltiplicano e, dopo un certo lasso di tempo, possono essere trasferiti in altre piante attraverso la saliva emessa dall'insetto nella fase di alimentazione. Dopo oltre 40 anni di tentativi sembrava che i fitoplasmi non si potessero coltivare su substrato artificiale, a differenza dei micoplasmi. In questo modo veniva a mancare uno degli approcci fondamentali nello studio del patogeno, la fase di laboratorio, oltre al fatto che non veniva soddisfatto il secondo postulato di Koch, relativamente alla definizione di una malattia ("Deve essere possibile isolare il microrganismo dall'ospite malato e farlo crescere in coltura pura").

Sinora per conservare in laboratorio un qualsia-

si ceppo di fitoplasma bisognava coltivare piante della specie sensibile infette micropropagate. Un'altra possibilità è l'utilizzo di specie test non direttamente legate al patogeno ma, essendo molto suscettibili alle infezioni dei fitoplasmi in genere, possono infettarsi facilmente con numerosi fitoplasmi legati sia a piante arboree che erbacee. Tra queste molto utilizzata è *Catharanthus roseus* o Pervinca del Madagascar, nota anche come pervinca.

Anche la Fondazione E. Mach ha un proprio laboratorio di micropropagazione dove sono mantenuti e studiati ceppi di *Candidatus Phytoplasma mali*, agente patogeno degli scopazzi del melo e realizza test diagnostici.

Negli ultimi anni il gruppo di ricerca della Prof.ssa Bertaccini dell'Università di Bologna, in collaborazione con la Mycoplasma Experience, azienda inglese che produce substrati per la coltura dei micoplasmi patogeni per uomo e animali, ha proposto un metodo per far crescere i fitoplasmi su un terreno di coltura axenico, vale a dire privo di flora estranea.

Nella prima fase del protocollo si ha il trasferimento del patogeno dal tessuto vegetale malato ad uno speciale terreno liquido, nel quale il tessuto è immerso. Il terreno di coltura contiene anche una sostanza che vira di colore con le variazioni di pH e segnala la crescita dei fitoplasmi. Quindi, se a determinate temperature il terreno liquido nel quale è immerso il tessuto vegetale infetto cambierà di colore, sarà indizio della presenza di fitoplasmi.

La fase successiva prevede il trasferimento del fitoplasma dal terreno liquido alla piastra su un terreno solido.

Dopo qualche giorno si avrà la crescita di colonie del fitoplasma, simili per morfologia e dimensioni a quelle dei micoplasmi. I ricercatori nei loro esperimenti hanno confermato la presenza dei diversi fitoplasmi utilizzati mediante analisi molecolari.

L'isolamento dalle piante è uno dei passaggi più critici. Il tempo necessario affinché avvenga il trasferimento del patogeno dipende dal ceppo del fitoplasma e dalle condizioni di crescita del materiale di partenza.

Finalmente dopo diversi decenni di studi con questa ricerca si è potuto dimostrare che anche i temibili fitoplasmi possono crescere e si possono indagare slegati dai loro ospiti, pianta e insetto vettore. Con tali conoscenze ora sarà possibile avere con più facilità collezioni di cep-

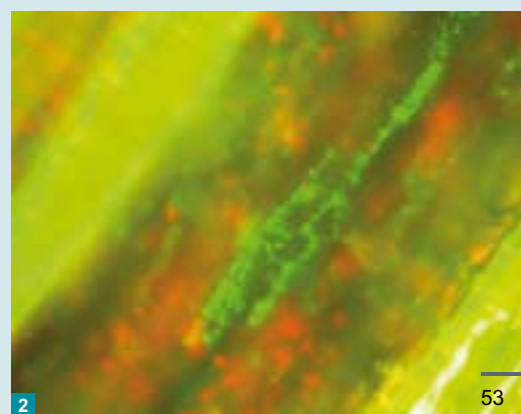


Foto 1: piantine di melo micropropagate, infettate da *Candidatus Phytoplasma mali*, presenti nel laboratorio di Micropropagazione della Fondazione E. Mach (foto Anna Maria Ciccotti).

Foto 2: test di immunofluorescenza; i puntini verdi al centro della foto evidenziano i fitoplasmi (foto Anna Maria Ciccotti).

pi in coltura e contribuirà alla lotta contro questi patogeni. Il protocollo proposto ha sicuramente un decorso molto lungo e l'isolamento iniziale del patogeno è vincolato ai germogli di pervinca micropropagata, precedentemente infettata (e non a partire direttamente da una pianta presa in campo, naturalmente infetta).

Possibili applicazioni nella coltivazione dei fitoplasmi ci potranno essere nelle tecniche di diagnosi, con la produzione di specifici antisieri, ma grande aspettativa viene posta alla ricerca di agenti biochimici atti a inibire lo sviluppo dei fitoplasmi. Quindi sarà possibile proseguire con più incisività nell'individuare possibili sistemi di cura diretta alla malattia, riducendo i danni e le perdite causate da questi patogeni alle più importanti colture agricole.

Altre possibili applicazioni potranno esserci sul fronte della ricerca di piante resistenti e negli studi di metodi di colonizzazione del patogeno nella piante e nell'insetto vettore, oltre che sui meccanismi messi in atto dal microrganismo nella patogenesi.

Conoscere con dettaglio i processi che stanno alla base della vita dei fitoplasmi, conosciuto come uno tra i più piccoli organismi capaci di riprodursi e di sopravvivere in due differenti regni, quello vegetale e quello animale, potrà aiutarci a svelare qualcosa in più sull'origine della vita e sui suoi meccanismi elementari. ■