

ISTITUTO DI PATOLOGIA VEGETALE DELL'UNIVERSITA' DI NAPOLI
PORTICI

G. CRISTINZIO, F. SCALA e C. NOVIELLO

**Differenziazione di alcune specie di *Phytophthora* mediante
l'uso dell'immunolettroforesi in due dimensioni**

Estratto dagli « Annali » della Facoltà di Scienze Agrarie
dell'Università di Napoli in Portici
SERIE IV, VOL. XVII, II SEMESTRE 1983

1983

Della Torre - Portici

Differenziazione di alcune specie di *Phytophthora* mediante l'uso dell'immunolettroforesi in due dimensioni

G. CRISTINZIO, F. SCALA e C. NOVIELLO

INTRODUZIONE

Molti caratteri morfologici sono stati presi in considerazione per l'identificazione delle specie appartenenti al genere *Phytophthora* de Bary (6, 9, 16, 20, 26, 27). La morfologia, però, usata come unico criterio per la classificazione delle specie di *Phytophthora*, frequentemente è risultata inadeguata. Infatti, le strutture sulle quali viene basata l'identificazione, spesso sono difficilmente osservabili e possono presentare una notevole variabilità morfologica (5, 25, 29). Pertanto, allo scopo di facilitare la differenziazione e di stabilire relazioni tassonomiche tra le specie di *Phytophthora*, in aggiunta alle consuete procedure morfologiche, in molte occasioni i micologi si sono avvalsi anche di tecniche come quelle biochimiche e sierologiche. Mediante l'uso della immunofluorescenza e della immunodiffusione, per esempio, Burrel et al. (3) hanno identificato la *P. cactorum* (Leb. e Cohn) Schroet, la *P. cinnamomi* Rands e la *P. erythroseptica* Pethybr.; Merz et al. (18), studiando sei specie eterotalliche di *Phytophthora*, hanno trovato che la *P. cinnamomi* è risultata sierologicamente distinta, mentre le altre cinque specie sono comprese in due gruppi sierologici. La *P. cinnamomi* e la *P. cambivora* Petri sono state differenziate dalla *P. cryptogea* Pethybr. e Laff. e dalla *P. drechsleri* Tucker, queste ultime morfologicamente e sierologicamente molto simili, impiegando antigeni estratti dal citoplasma e dalla parete cellulare con tecniche di immunodiffusione, agglutinazione e immunofluorescenza (8). Recentemente la *P. capsici* Leonian è stata differenziata dalla *P. nicotianae* Breda de Haan var. *parasitica* (Dastur) Waterhouse e da altre sette specie saggiando alla doppia diffusione antigeni con antisieri opportunamente assorbiti (4).

In questa nota viene descritta la differenziazione sierologica di diverse specie di *Phytophthora* mediante l'uso dell'immunolettroforesi in due dimensioni, una tecnica ad alto potere risolutivo.

Ventotto isolati appartenenti a nove specie di *Phytophthora* sono stati saggiati contro tre antisieri preparati con antigeni di *P. cactorum*, *P. capsici* e *P. nicotianae* var. *parasitica*. Nella tabella n. 1 sono riportati gli isolati di *Phytophthora* usati in questo studio con le piante ospiti e la provenienza.

— *Preparazione degli antigeni*: i 28 isolati sono stati allevati per sette giorni a 21°C su un agitatore rotante in beutine da 150 ml contenenti 40 ml di V-8 brodo (200 ml Campbell's Soup Company V-8 juice, 2,5g CaCO₃ e 800 ml H₂O distillata) inseminate con dischetti di micelio. Il micelio è stato raccolto su 4 strati di garza, lavato con soluzione fisiologica, sottoposto per 5 volte a congelamento e disgelo ed infine conservato a -20°C. Per l'estrazione degli antigeni il micelio è stato prima omogeneizzato, triturandolo in un mortaio con quantità minime di tampone fosfato 0,15 M pH 7,2, e poi sottoposto ad ultrasonificazione per 5 min a 20 kHz usando un Braun-Sonic modello 300-S (Braun-Melsungen). La sospensione ottenuta è stata centrifugata a 10.000 g per 15 min ed il supernatante usato come antigene. Per le immunizzazioni dei conigli e per i tests sierologici, il contenuto proteico di ogni estratto miceliare, determinato col metodo di Lowry et al. (17), è stato aggiustato alla concentrazione di 1mg/ml. Gli antigeni preparati in questo modo hanno perduto la loro attività dopo 1-2 mesi.

— *Preparazione degli antisieri*: gli antigeni per la preparazione degli antisieri sono stati estratti da *P. cactorum* (isolato Ph 165), *P. capsici* (isolato Ph 93) e *P. nicotianae* var. *parasitica* (isolato Ph 99). Per ognuna delle predette 3 specie di *Phytophthora* sono stati immunizzati due conigli, praticando cinque iniezioni intramuscolari di 2 ml (1 ml di estratto antigenico emulsionato con 1 ml di adiuvante completo di Freund, Difco) ad intervalli di due settimane. Una settimana dopo l'ultima dose sono stati fatti prelievi di sangue dalle vene marginali delle orecchie e la presenza di anticorpi è stata saggiata col metodo della doppia diffusione come descritto da Iannelli et al. (15).

— *Immunolettroforesi in due dimensioni*: su piastre di vetro di 94 x 94 mm sono stati versati 14 ml di agarose (Behring) all'1% disciolto in barbital pH 8,6 e forza ionica 0,02, cioè il tampone usato per gli elettrodi. In ogni piastra sono stati saggiati quattro campioni sottoponendoli ad elettroforesi nella prima e seconda dimensione. Quattro pozzetti, ciascuno da 20 µl, sono stati scavati nel gel seguendo lo schema usato da Hughes et al. (14). L'elettroforesi nella prima dimensione è stata effettuata applicando 10 V/cm a 15°C. Allo scopo di ottenere patterns immunolettroforetici comparabili, la durata degli esperimenti è stata determinata seguendo una corsa di 30 mm della sieralbumina bovina colorata con blu di bromofenolo (circa 75 min in tutte le prove). Dopo l'elettroforesi nella prima dimensione, sulla piastra sono state scavate due finestre di 70 x 35 mm, sempre secondo lo schema di Hughes et al. (14), ed in ciascuna sono stati versati 3 ml di aga-

TABELLA 1 - Pianta ospite e provenienza degli isolati di *Phytophthora*.

Specie	Isolati	Pianta	Provenienza
<i>P. cactorum</i> (Leb. e Cohn) Schroet	Ph 158	<i>Calceolaria herbeohybrida</i> Vass.	Napoli
	Ph 165	<i>Fragaria grandiflora</i> Elirh.	Caserta
	Ph 167	<i>Fragaria grandiflora</i> Elirh.	Salerno
	Ph 202	<i>Pirus malus</i> L.	Caserta
<i>P. capsici</i> Leonian	Ph 90A ₁	<i>Capsicum annuum</i> L.	Caserta
	Ph 196A ₁	<i>Capsicum annuum</i> L.	Potenza
	Ph 198A ₁	<i>Capsicum annuum</i> L.	Napoli
	Ph 93A ₂	<i>Cucurbita moscata</i> Duc. ex Poiret	Salerno
	Ph 132A ₂	<i>Capsicum annuum</i> L.	Caserta
	Ph 200A ₂	<i>Capsicum annuum</i> L.	Caserta
<i>P. cinnamomi</i> Rands	Ph 208A ₂	Ignota	A.T.C.C.
	Ph 211A ₁	Ignota	A.T.C.C.
<i>P. cryptogea</i> Pethybr. e Laff.	Ph 97A ₁	<i>Gerbera jamesoni</i> Bolns	Torino
	Ph 207A ₂	Ignota	A.T.C.C.
	Ph 210A ₁	Ignota	A.T.C.C.
<i>P. erythrosepica</i> Pethybr.	Ph 214	Ignota	C.B.S.
<i>P. heveae</i> Thompson	Ph 4	Ignota	Ignota
<i>P. nicotianae</i> B. de Haan var <i>nicotianae</i>	Ph 203A ₁	Ignota	A.T.C.C.
	Ph 204A ₂	Ignota	A.T.C.C.
	Ph 217A ₂	<i>Nicotiana tabacum</i> L.	Salerno
<i>P. nicotianae</i> B. de Haan var <i>parasitica</i> (Dastur) Water.	Ph 99A ₁	<i>Dianthus caryophyllus</i> L.	Torino
	Ph 141A ₁	<i>Lycopersicon esculentum</i> Mil.	Napoli
	Ph 205A ₁	Ignota	A.T.C.C.
	Ph 172A ₂	<i>Lycopersicon esculentum</i> Mil.	Caserta
	Ph 201A ₂	<i>Capsicum annuum</i> L.	Salerno
	Ph 206A ₂	Ignota	A.T.C.C.
<i>P. syringae</i> (Kleb) Kleb	Ph 169	<i>Citrus sinensis</i> Osberk	Napoli
	Ph 215	Ignota	C.B.S.

rose all'1% contenenti 300 µl di antisiero. A questo punto è stata eseguita l'elettroforesi sulla seconda dimensione applicando 1 V/cm per 16 ore a 15°C. Per ogni isolato sono state fatte due preparazioni antigeniche ed ogni preparazione è stata saggiata in duplicato almeno due volte. Gli immunoprecipitati sono stati colorati con Coomassie brilliant blue R.

RISULTATI

La differenziazione delle specie basata unicamente sul numero di bande prodotte da un solo antisiero non è risultata possibile in quanto specie diverse esibiscono con lo stesso antisiero un egual numero di bande, come si rileva chiaramente dai dati riportati nella tabella n. 2. Comunque, se oltre al numero sono considerate anche la distanza di migrazione, l'altezza e l'intensità di colorazione delle bande, le specie si possono facilmente differenziare anche con un solo antisiero, come è facilmente deducibile dalla tabella n. 3.

Un tipico pattern immunoelettroforetico ottenuto nella presente indagine è mostrato nelle figure n. 1 e 2. In questo esperimento gli antigeni estratti dalla *P. capsici* sono stati fatti reagire con il siero anti-*nicotianae* var. *parasitica* producendo sette linee di precipitazione che differiscono nella loro distanza di migrazione dal pozzetto di applicazione, nell'altezza e nell'intensità di colorazione. Pertanto, allo scopo di caratterizzare il pattern ottenuto, la distanza di migrazione e l'altezza delle bande sono state misurate come indicato nella figura n. 2. Nella stessa figura, inoltre, sono state indicate con linea continua le bande colorate più intensamente. I patterns ottenuti saggiando le nove specie con i tre antisieri sono stati caratterizzati allo stesso modo ed i risultati sono riportati nella tabella n. 3.

I tre antisieri hanno prodotto il più elevato numero di bande quando saggiati con gli antigeni omologhi, fatta eccezione del siero anti-*nicotianae* var. *parasitica* che saggiato con l'antigene della *P. cactorum* ha esibito lo stesso numero di bande dell'antigene omologo. La *P. nicotianae* var. *nicotianae* e la *P. nicotianae* var. *parasitica* sono state facilmente differenziate dalle altre specie ma non tra loro, avendo reagito in modo quasi identico con i tre antisieri.

Gli immunoprecipitati degli isolati appartenenti ai gruppi di compatibilità A₁ e A₂ delle specie studiate sono risultati indistinguibili, sia in base al numero che alle caratteristiche delle bande dei patterns ottenuti con tutti e tre gli antisieri.

DISCUSSIONE

I motivi che rendono difficile ed incerta l'individuazione delle specie del genere *Phytophthora* sono essenzialmente i seguenti: estrema variabilità dei caratteri morfologici assunti a base dei vari sistemi di classificazione succedutisi nel tempo e derivante anche dalla mancata adozione di condi-

TABELLA 2 - Numero delle bande di precipitazione nei patterns immunoelettroforetici ottenuti saggiando i tre antisieri anti-nicotianae var. parasitica, anti-capsici e anti-cactorum con gli antigeni delle nove specie di *Phytolthora*.

N bande	Anti-nicotianae var. parasitica	N. bande	Anti-capsici	N. bande	Anti-cactorum
10	<i>P. cactorum</i>	11	<i>P. capsici</i>	10	<i>P. cactorum</i>
10	<i>P. nicotianae</i> var. <i>nicotianae</i>	10	<i>P. cinnamomi</i>	7	<i>P. erythroseptica</i>
10	<i>P. nicotianae</i> var. <i>nicotianae</i>	8	<i>P. nicotianae</i> var. <i>nicotianae</i>	5	<i>P. capsici</i>
10	<i>P. nicotianae</i> var. <i>parasitica</i>	8	<i>P. nicotianae</i> var. <i>parasitica</i>	5	<i>P. syringae</i>
9	<i>P. erythroseptica</i>	7	<i>P. erythroseptica</i>	4	<i>P. cryptogea</i>
8	<i>P. cinnamomi</i>	6	<i>P. cactorum</i>	4	<i>P. nicotianae</i> var. <i>nicotianae</i>
7	<i>P. capsici</i>	6	<i>P. syringae</i>	4	<i>P. nicotianae</i> var. <i>parasitica</i>
7	<i>P. cryptogea</i>	4	<i>P. cryptogea</i>	3	<i>P. cinnamomi</i>
7	<i>P. syringae</i>	4	<i>P. heveae</i>	3	<i>P. heveae</i>

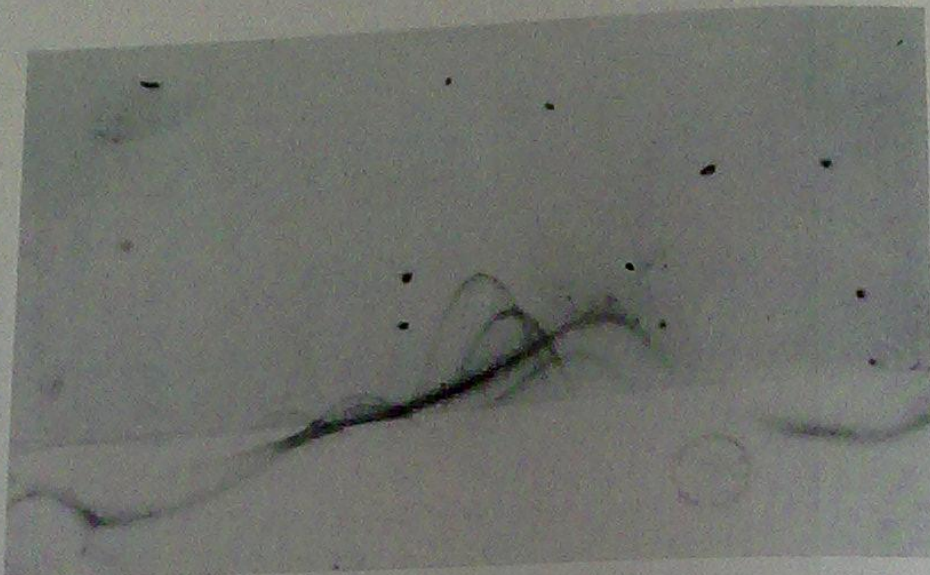


Fig. 1 - Immunolettroforesi bidimensionale di *P. capsici*. Il gel per la seconda dimensione conteneva $12,2 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ di siero anti-nicotianae var. parasitica. L'anodo si trovava a destra durante l'elettroforesi nella prima dimensione ed in alto nella seconda dimensione. I dettagli sperimentali sono descritti nel testo.

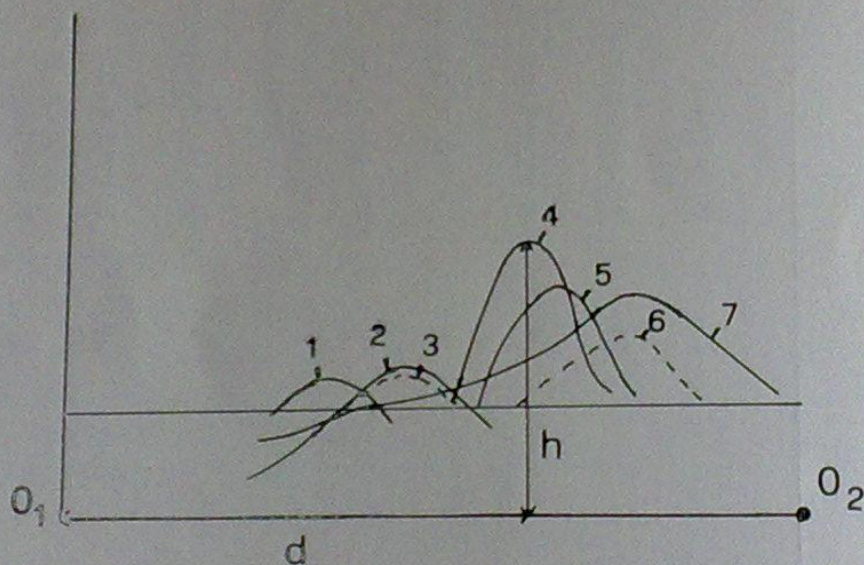


Fig. 2 - Diagramma della fig. 1: gli antigeni sono stati numerati progressivamente con l'aumentare della distanza di migrazione. Le linee continue indicano gli antigeni colorati più intensamente. Nel diagramma viene mostrato anche come è stata misurata la distanza di migrazione e l'altezza di una delle bande (n. 4). O_1 è il centro di applicazione; O_2 è il centro di uno degli altri tre pozzetti di applicazione sulla stessa piastra.

zioni standardizzate di allevamento, incluso un substrato colturale a composizione definita; inadeguatezza delle nostre conoscenze sulle basi fisiologiche e biochimiche che presiedono alla differenziazione di determinate strutture morfologiche ed al fenomeno della sessualità, come è chiaramente deducibile dal notevole stato di confusione riscontrabile in letteratura

TABELLA 3 - Numero di bande di precipitazione nei patterns immunoelettroforetici ottenuti saggiando i tre sieri anti-nicotianae var. parasitica, anti-capsici e anti-cactorum con gli antigeni di nove specie di *Phytophthora*. Sono riportate anche le medie dei valori ottenuti nei vari esperimenti della distanza di migrazione e dell'altezza delle bande. Le linee colorate più intensamente in ogni pattern sono indicate con un asterisco (a = altezza (mm); m = distanza di migrazione (mm)).

Phytophthorae	n. bande	Anti-nicotianae var. parasitica										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Cactorum	10	m	9	9,5	11	13	16	16	16,5	17	18	20,5
		a	6,5*	11,5	7,5	6*	13*	14,5*	6,5	10,5*	20	7*
Capsici	7	m	12	16,5	16,5	22,5	24	28,5	29,5			
		a	7*	7,5*	6,5	14*	11,5*	7,5	10,5*			
Cinnamomi	8	m	15	17,5	18	20	21	22,5	25	26		
		a	9,5*	7,5	6	8*	9,5	11	14*	23,5*		
Cryptogea	7	m	12,5	13,5	14,5	19,5	20	23	23,5			
		a	8	7*	7,5	11*	13,5*	10,5*	8,5			
Erythroseptica	9	m	8	12,5	12,5	15,5	15,5	16,5	17	18	18,5	
		a	8,5*	9*	7,5	20*	25,5*	14,5	9	13	11,5	
Heveae	6	m	9	14	17	18	19	20				
		a	6,5*	7*	7,5	10*	11,5*	7,5				
Nicotianae var. nicotianae	10	m	11	12	12,5	14,5	14,5	15	15	17,5	18	20
		a	7,5	9*	9*	7,5*	8	8,5*	14*	15*	6,5*	7
Nicotianae var parasitica	10	m	10,5	11,5	12	13,5	13,5	14,5	14,5	16,5	17	18,5
		a	7	9,5*	9*	7*	8*	9*	15,5*	16,5*	6,5*	6
Syringae	7	m	9,5	17	17	17,5	18	18,5	19,5			
		a	10,5*	19*	29,5*	7,5	10,5*	6,5	8*			

segue TABELLA 3

Phytophthorae	n. bande	Anti-capsici											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
Cactorum	6	m	7,5	12	20	21	23	23					
		a	6	7	6,5	9,5*	8,5*	8*					
Capsici	11	m	7	10	11	13	13	13,5	17,5	19	20	21,5	22
		a.	7,5	6	6,5	5*	5,5*	9*	6*	7	13,5*	5,5*	8,5
Cinnamomi	10	m	6,5	12,5	13	14	18	18	20	21	22,5	22,5	
		a	5,5	6	7,5	7	6,5	11*	11,5*	25*	10*	7,5	
Cryptogea	4	m	11	15	18	23							
		a	6	17*	8,5	7,5*							
Erythroseptica	7	m	7	12	15	20	22	22	23				
		a	5,5	6*	10*	7	9,5	6,5	6				
Heveae	4	m	6	15	22	22,5							
		a	5,5	9*	17*	10,5							
Nicotianae var. nicotianae	8	m	10	11	14	14	16	18	19	20			
		a	6,5	7	10,5*	7*	8	6,5	13*	6,5			
Nicotianae var. parasitica	8	m	8,5	10	13	14	15	19	19	19,5			
		a	6	7	11*	8*	8,5	12*	7,5	6			
Syringae	6	m	9	16	17,5	24	24	24,5					
		a	6,5	14*	21*	17*	15,5	8,5					

soprattutto per le specie classicamente definite eterotalliche (1, 2, 7, 11, 21, 22, 23, 28, 30). L'attuale stato di incertezza è del resto dimostrato dal fiorire in questi ultimi tempi di formulazioni, definite *ab initio* provvisorie, di

segue TABELLA 3

Phytophthorae	n. bande	Anti-cactorum										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Cactorum	10	m	6	9	10	10	13	14	18	21	21	21,5
		a	5,5	6,5	6*	8,5	6	5,5*	6,5	9,5*	8,5*	7,5*
Capsici	5	m	7	13	13	24	24					
		a	6	6*	8	6,5	8,5					
Cinnamomi	3	m	12	18	22							
		a	8,5	6,5	9,5*							
Cryptogea	4	m	22	22	22,5	23						
		a	11,5*	12,5	7,5	12*						
Erythroseptica	7	m	6	11	11	16	20	20	21			
		a	7,5	9,5*	8,5*	9	8,5*	6,5	6			
Heveae	3	m	13	21	21							
		a	7,5	11*	11,5*							
Nicotianae var. nicotianae	4	m	10	13	17	21						
		a	16	11	11,5*	14						
Nicotianae var parasitica	4	m	11,5	14	18	20,5						
		a	14,5	11	11,5*	15						
Syringae	5	m	16	19	19,5	23	24					
		a	12*	10*	7,5	8,5*	6,5					

« chiave tabulare » (20), « chiavi sinottiche » (9) e « gruppi di affinità » (10), quest'ultimi derivanti da un apprezzabile tentativo di applicazione di tassonomia numerica.

Infatti HO (9 e 10) prendendo in esame tutti i caratteri morfologici, fisiologici e patogenetici delle specie di *Phytophthora* fitopatogene ed assegnando un valore diagnostico di 3 ai caratteri morfologici più stabili, di 2 a quelli meno stabili e di 1 ai caratteri morfologici più instabili e a tutti i caratteri fisiologici e patogenetici, elabora un « coefficiente di similarità ponderato » (=WSC) costituito dal rapporto fra la somma dei valori diagnostici dei caratteri collimanti e la somma dei valori diagnostici di tutti i caratteri considerati. Sulla base del predetto coefficiente HO (10) stabilisce per le specie fitopatogene di *Phytophthora* 5 gruppi di affinità, dei quali i primi 4 corrispondono, con lievi modifiche, ai primi 4 gruppi di Waterhouse (27) e di Newhook et al. (20), mentre il quinto gruppo risulta dalla fusione dei gruppi quinto e sesto di Waterhouse.

Le nove specie di *Phytophthora*, oggetto della presente indagine, afferiscono ai seguenti gruppi di Waterhouse (27) e di HO (10):

Specie	Gruppi	
	Waterhouse	HO
— <i>P. cactorum</i>	1	1
— <i>P. capsici</i>	2	2
— <i>P. heveae</i>	2	2
— <i>P. nicotianae</i> var. <i>nicotianae</i>	2	2
— <i>P. nicotianae</i> var. <i>parasitica</i>	2	2
— <i>P. syringae</i>	3	3
— <i>P. cinnamomi</i>	6	5
— <i>P. cryptogea</i>	6	5
— <i>P. erythroseptica</i>	6	5

La ricerca di nuove tecniche da porre in un rapporto almeno complementare con i criteri morfologici appare quindi ampiamente giustificata dalla inadeguatezza delle nostre conoscenze, soprattutto nel settore genetico e dalla provvisorietà che caratterizza gli attuali sistemi di classificazione.

Le tecniche immunoelettroforetiche bidimensionali sono già state impiegate nella tassonomia e nella identificazione dei funghi. Hornok (12) ha mostrato che il *Fusarium graminearum* Schwabe ed il *F. equiseti* (Corda) Sacc. si possono distinguere mediante immunoelettroforesi bidimensionale in tandem, ma non con la doppia diffusione. Lo stesso autore ha applicato questa tecnica per determinare le relazioni sierologiche intercorrenti fra tredici specie di *Fusarium* appartenenti alle sezioni Gibbosum e Discolor (13). Scott (24) ha studiato mediante immunoelettroforesi triplicata e diffusione doppia le relazioni sierologiche fra tre specie di *Sclerotinia*.

In questa indagine l'immunolettroforesi bidimensionale si è dimostrata una tecnica particolarmente efficace per la differenziazione delle diverse specie di *Phytophthora*. Infatti, i nostri dati hanno evidenziato che le varie specie possono essere chiaramente distinte saggiandole anche contro un solo antisiero se gli immunoprecipitati vengono esaminati in base al numero di bande ed ai parametri che le caratterizzano. L'uso di più antisieri ha mostrato che in alcuni casi si può avere una più agevole differenziazione delle specie.

La *P. nicotianae* var. *nicotianae* e la *P. nicotianae* var. *parasitica*, molto vicine morfologicamente (9, 27) non sono risultate distinguibili poiché hanno prodotto patterns praticamente uguali con ognuno dei tre antisieri. L'assenza di differenze sierologiche significative tra queste due *Phytophthorae*, comunque era già stata messa in evidenza da Morton e Dukes (19) in uno studio effettuato utilizzando la tecnica della diffusione doppia. Altre specie morfologicamente vicine, come la *P. capsici* e le due varietà di *P. nicotianae* (27), hanno mostrato invece differenze sierologiche molto chiare.

Gli isolati appartenenti ai gruppi di compatibilità A₁ e A₂, come già era stato mostrato in altre indagini (4, 8), non sono risultati differenziabili, suggerendo in tal modo per i due gruppi una identità sierologica.

Infine, il fatto che tutti gli isolati di una stessa specie abbiano reagito allo stesso modo con ognuno dei tre antisieri sembra particolarmente significativo per il notevole valore diagnostico che conferisce alla tecnica usata in questo studio.

Anche se i dati riportati non possono che essere considerati preliminari ed hanno bisogno di essere suffragati da risultati ottenuti con altre tecniche ed impiegando un maggior numero di specie e di isolati, tuttavia sembrano indicare che gli attuali raggruppamenti tassonomici sono costituiti in gran parte da entità sierologicamente non affini.

Ricevuto il 18 - 7 - 1983

RIASSUNTO

Gli estratti antigenici di ventotto isolati appartenenti a nove specie di *Phytophthora* sono stati sottoposti ad immunolettroforesi bidimensionale con gli antisieri di *P. cactorum*, *P. capsici* e di *P. nicotianae* var. *parasitica*. I precipitati immunolettroforetici ottenuti sono stati comparati sulla base del numero, della distanza di migrazione e della altezza delle linee di precipitazione. Gli isolati di ciascuna specie hanno prodotto patterns identici con ognuno dei tre antisieri. Tutte le specie saggiate sono state differenziate tra loro, con la sola eccezione della *P. nicotianae* var. *nicotianae* con la *P. nicotianae* var. *parasitica*, che hanno mostrato patterns immunolettroforetici quasi identici con ciascun antisiero. Con questa tecnica non è stato possibile distinguere gli isolati appartenenti ai gruppi di compatibilità A₁ e A₂ delle specie eterotalliche.

SUMMARY

Antigens of twenty-eight isolates, belonging to nine *Phytophthora* species, were subjected to crossed immunoelectrophoresis with anti-cactorum, anti-capsici and anti-nicotianae var. parasitica sera. Immunoprecipitate patterns obtained were compared on the basis of the number, the migration distance and height of precipitin lines. Isolates

of each species gave identical patterns with all the three antisera. The species used were easily differentiated with the exception of *P. nicotianae* var. *nicotianae* and *P. nicotianae* var. *parasitica* that displayed almost identical immunopatterns with each serum. Isolates representing A₁ and A₂ mating types of heterothallic species were indistinguishable by means of this technique.

BIBLIOGRAFIA

- (1) BRASIER C. M. 1971 - Induction of sexual reproduction in single A₂ isolates of *Phytophthora* species by *Trichoderma viride*. *Nature New Biology* 231, 283.
- (2) BRASIER C. M. and GRIFFIN M. J. 1979 - The taxonomy of *Phytophthora palmivora* on cocoa. *Trans. Brit. mycol. Soc.* 72, 111-143.
- (3) BURREL G. G., CLAYTON C. W., GALLEGLY M. E. and LILLY V. G. 1966 - Factors affecting the antigenicity of mycelium of three species of *Phytophthora*. *Phytopathology* 56, 422-426.
- (4) CRISTINZIO G. 1982 - Possibile differenziazione sierologica della *Phytophthora capsici*. *Ann. Fac. Sc. Agr. Univ. Napoli, Portici Ser. IV* 16, 118-124.
- (5) ERWIN D. C., ZENTMYER G. A., GALINDO J. and NIEDERHAUSER J. S. 1963 - Variation in the genus *Phytophthora*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 1, 375-396.
- (6) FREZZI M. J. 1950 - Las especies de *Phytophthora* en la Argentina. *Rev. Inv. Agric.* 4, 47-134.
- (7) GRIFFIN M. G. 1977 - Cocoa *Phytophthora* workshop. Rothamsted Experimental Station, England, 24-26 May 1976. *PANS* 23, 107-110.
- (8) HALSALL D. M. 1976 - Specificity of cytoplasmic and cell-wall antigens from four species of *Phytophthora*. *J. Gen. Microbiol.* 94, 149-158.
- (9) HO H. H. 1981 - Synoptic keys to the species of *Phytophthora*. *Mycologia* 73, 705-714.
- (10) HO H. H. 1982 - affinity groups among plant pathogenic species of *Phytophthora* in culture. *Mycopathologia* 79, 141-146.
- (11) HO H. H., ZENTMYER G. A. and ERWIN D. C. 1977 - Morphology of sex organs of *Phytophthora cambivora*. *Mycologia* 69, 641-646.
- (12) HORNOK L. 1978 - On inadequacy of the double diffusion tests in *Fusarium* serotaxonomy. *Acta Phytopathol.* 13, 357-363.
- (13) HORNOK L. 1980 - Serotaxonomy of *Fusarium* species of the section *Gibbosum* and *Discolor*. *Trans. Brit. mycol. Soc.* 74, 73-78.
- (14) HUGHES H. P. A., LE D. L. and BALFOUR A. H. 1980 - A multiple staining technique for agarose gels. *Science Tools* 27, 39-41.
- (15) IANNELLI D., CRISTINZIO G., CAPPARELLI R., MARZIANO F., SCALA F. and NOVIELLO C. 1982 - Serological differentiation among *formae speciales* and physiological races of *Fusarium oxysporum*. *Mycologia* 74, 313-319.
- (16) LEONIAN L. H. 1934 - Identification of *Phytophthora* species. *Agric. Exp. Sta. W. Virginia Bull.* 262, 36 pp.
- (17) LOWRY O. H., ROSEBROUGH N. J., FARR A. L. and RANDALL R. J. 1951 - Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chemistry* 193, 265-275.
- (18) MERZ W. G., BURREL R. G. and GALLEGLY M. E. 1969 - A serological comparison of six heterothallic species of *Phytophthora*. *Phytopathology* 59, 367-370.
- (19) MORTON D. J., and DUKES P. D. 1967 - Serological differentiation of *Pythium aphanidermatum* from *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* and *Phytophthora parasitica*. *Nature*, 587, 925.
- (20) NEWHOOK F. J., WATERHOUSE G. M. and STAMPS D. J. 1978 - Tabular keys to the species of *Phytophthora* de Bary. *CMI Mycological paper* 143, 1-20.
- (21) NOVIELLO C., CRISTINZIO G. e ALOJ B. 1977 - Una grave malattia della zucca in Campania. *Ann. Fac. Sc. Agr. Univ. Napoli, Portici Ser. IV* 11, 11-22.
- (22) REEVES R. J. and JACKSON R. M. 1974 - Stimulation of sexual reproduction in *Phytophthora* by damage. *J. Gen. Microbiol.* 84, 303-310.
- (23) SAVACE E. J., CLAYTON C. W., HUNTER J. H., BRENNEMAN J. A., LAVIOLA C. and GALLEGLY M. E. 1968 - Homothallism, heterothallism and interspecific hybridisation in the genus *Phytophthora*. *Phytopathology* 58, 1004-1021.

- (24) SCOTT S. W. 1981 - Serological relationship of three *Sclerotinia* species. Trans. Brit. mycol. Soc. 77, 674-676.
- (25) TRICHILO P. J. and ARAGAKI M. 1982 - Sporangial caducity and pedicel length of *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica*. Mycologia 74, 927-931.
- (26) TUCKER C. M. 1931 - Taxonomy of the genus *Phytophthora* de Bary. Univ. Missouri Agric. Exp. Sta. Bull. 153, 1-208.
- (27) WATERHOUSE G. M. 1963 - Key to the species of *Phytophthora* de Bary. CMI Mycological paper 92, 1-22.
- (28) ZENTMYER G. A. 1952 - A substance stimulating sexual reproduction in *Phytophthora cinnamomi*. Phytopathology 42, 24.
- (29) ZENTMYER G. A., LEARY J. V., KLUREL L. J. and GRANTHAM G. L. 1976 - Variability in growth of *Phytophthora cinnamomi* in relation to temperature. Phytopathology 66, 982-986.
- (30) ZENTMYER G. A., KAOSIRI T. and IDOSU G. 1977 - Taxonomic variants in the *Phytophthora palmivora* complex. Trans. Brit. mycol. Soc. 69, 329-332.