Ciclo di Training courses SUS-MIRRI.IT

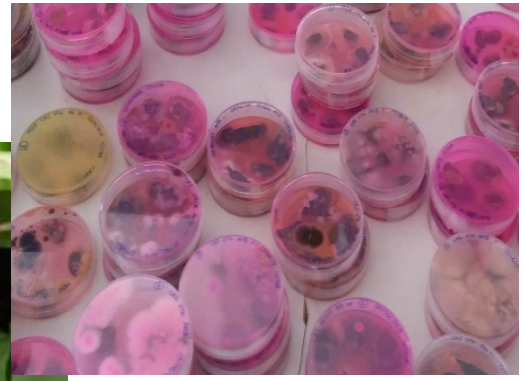
Isolation and identification of plant pathogens based on biological and molecular techniques.

Organizzatore: Università degli studi di Torino

23 gennaio 2024

Corso online

Finanziato dall'Unione europea NextGenerationEU
Ministero dell'Università e della Ricerca
Italiadomani PIANO NAZIONALE DI RIPRESA E RESILIENZA
SUS-MIRRI.IT



Isolamento e identificazione di patogeni vegetali

- Introduzione generale
- Identificazione su base morfologica
- Identificazione su base ecologica
- Identificazione su base molecolare e filogenesi

Finanziato dall'Unione europea NextGenerationEU
Ministero dell'Università e della Ricerca
Italiadomani PIANO NAZIONALE DI RIPRESA E RESILIENZA
SUS-MIRRI.IT

Introduzione generale

- Patologia vegetale
- Eziologia
- Epidemiologia
- Fitoiatria
- Fitopatologia

DIAGNOSTICA FITOPATOLOGICA

Finanziato dall'Unione europea NextGenerationEU
Ministero dell'Università e della Ricerca
Italiadomani PIANO NAZIONALE DI RIPRESA E RESILIENZA
SUS-MIRRI.IT

Diagnosi delle malattie: diversi livelli a seconda dell'obiettivo e del caso studio

ANALISI VISIVA DEI SINTOMI E SEGNI IN CAMPO

Finanziato dall'Unione europea NextGenerationEU
Ministero dell'Università e della Ricerca
Italiadomani PIANO NAZIONALE DI RIPRESA E RESILIENZA
SUS-MIRRI.IT

Diagnosi delle malattie: diversi livelli a seconda dell'obiettivo e del caso studio

Campionamento

- Il campione raccolto deve essere **rappresentativo** di tutte le fasi evolutive della malattia
- Includo: **diverse parti di pianta** (Piante erbacee: raccolte con pane di terra e apparati radicali; Piante arbustive o arboree: raccolta di singoli organi), campioni rappresentativi delle **sintomatologie a vari stadi**, e **parti di pianta apparentemente sane** (asintomatiche)

Food and Agriculture Organization of the United Nations

International Plant Protection Convention
Protecting the world's plant resources from pests

Importante
Includere, al momento del campionamento, informazioni su luogo, condizioni meteo, colture precedenti, eventuale utilizzo di agrofarmaci, età delle piante o grado di maturazione

Finanziato dall'Unione europea NextGenerationEU
Ministero dell'Università e della Ricerca
Italiadomani PIANO NAZIONALE DI RIPRESA E RESILIENZA
SUS-MIRRI.IT

Diagnosi delle malattie: diversi livelli a seconda dell'obiettivo e del caso studio

Analisi visiva

IN LABORATORIO …

Isolamento

Finanziato dall'Unione europea NextGenerationEU
Ministero dell'Università e della Ricerca
Italiadomani PIANO NAZIONALE DI RIPRESA E RESILIENZA
SUS-MIRRI.IT

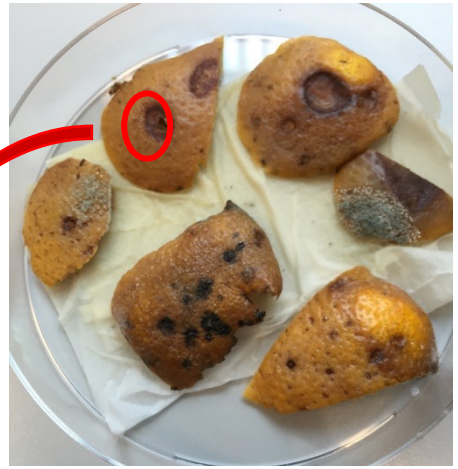
Diagnosi delle malattie: diversi livelli a seconda dell'obiettivo e del caso studio

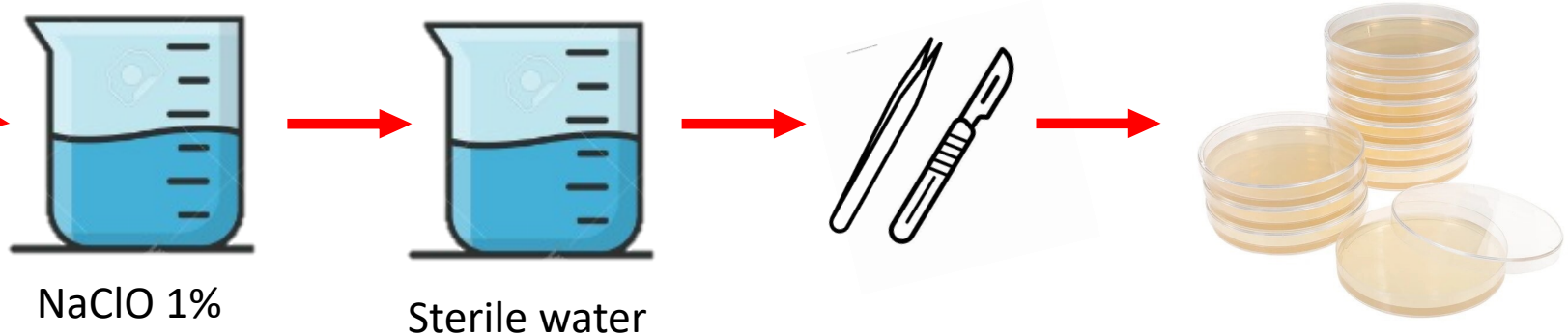
Analisi visiva

Finanziato dall'Unione europea NextGenerationEU
Ministero dell'Università e della Ricerca
Italiadomani PIANO NAZIONALE DI RIPRESA E RESILIENZA
SUS-MIRRI.IT

Diagnosi delle malattie: diversi livelli a seconda dell'obiettivo e del caso studio

Isolamento



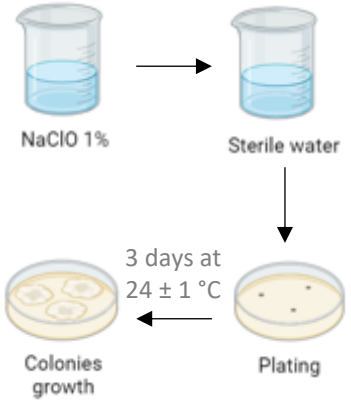


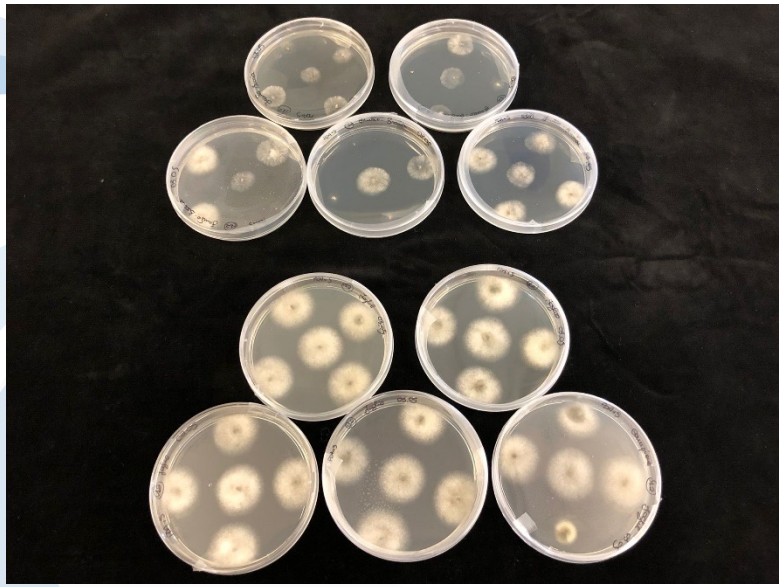
NaClO 1%
Etanolo 70%

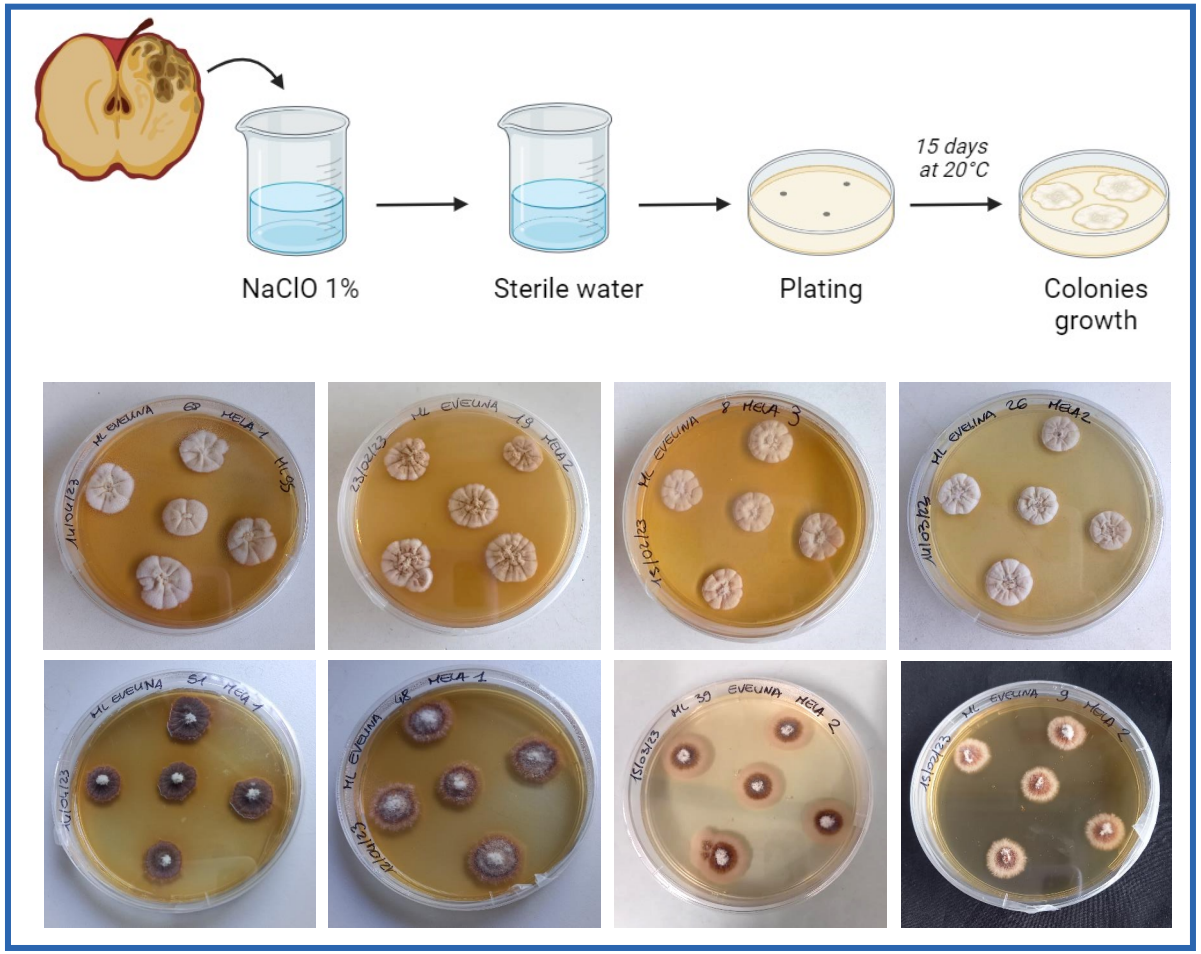
Sterile water

Finanziato dall'Unione europea NextGenerationEU
Ministero dell'Università e della Ricerca
Italiadomani PIANO NAZIONALE DI RIPRESA E RESILIENZA
SUS-MIRRI.IT

Diagnosi delle malattie: diversi livelli a seconda dell'obiettivo e del caso studio

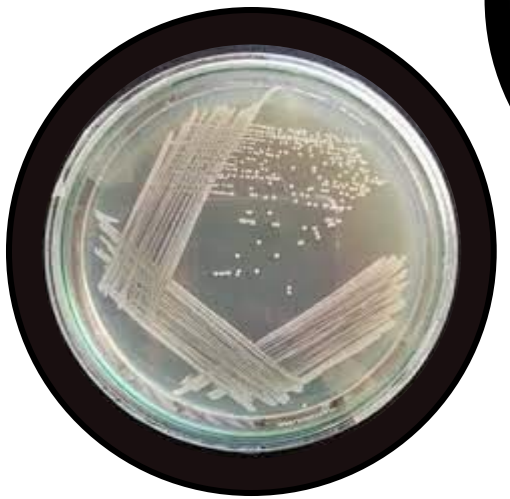


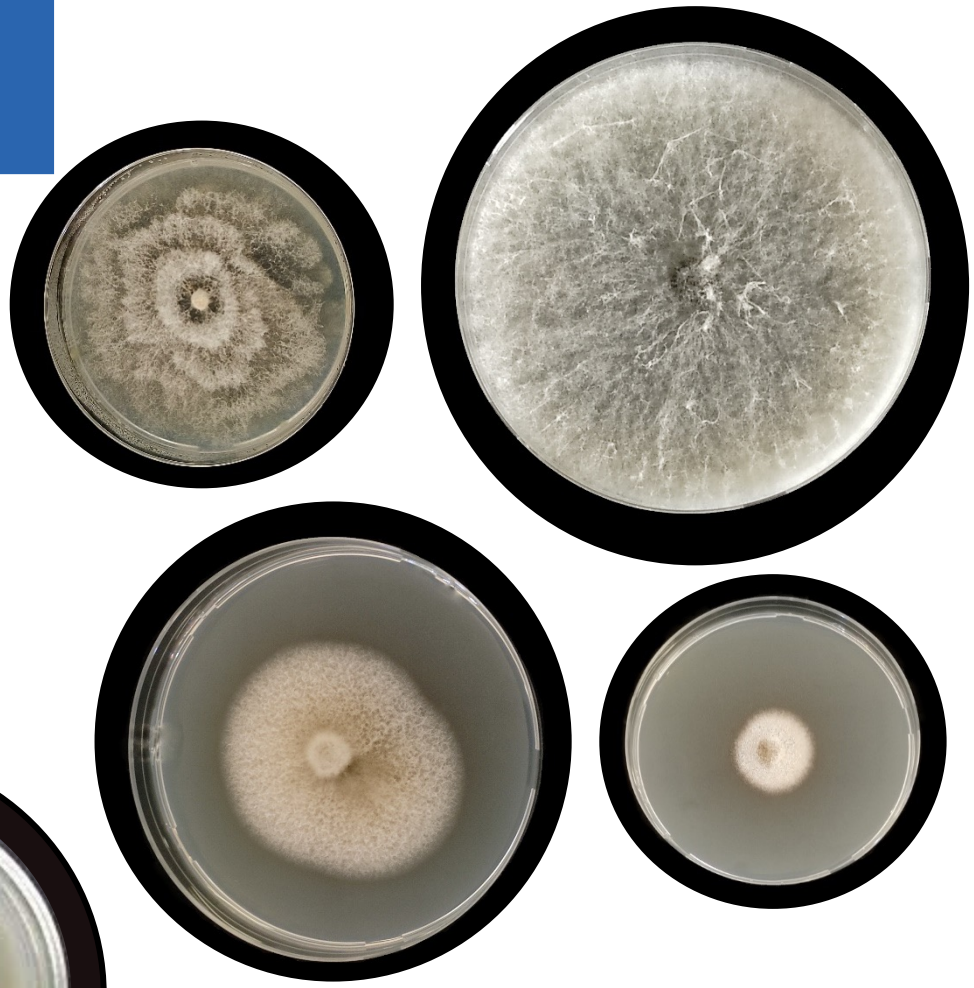




Finanziato dall'Unione europea NextGenerationEU
Ministero dell'Università e della Ricerca
Italiadomani PIANO NAZIONALE DI RIPRESA E RESILIENZA
SUS-MIRRI.IT

Identificazione morfologica



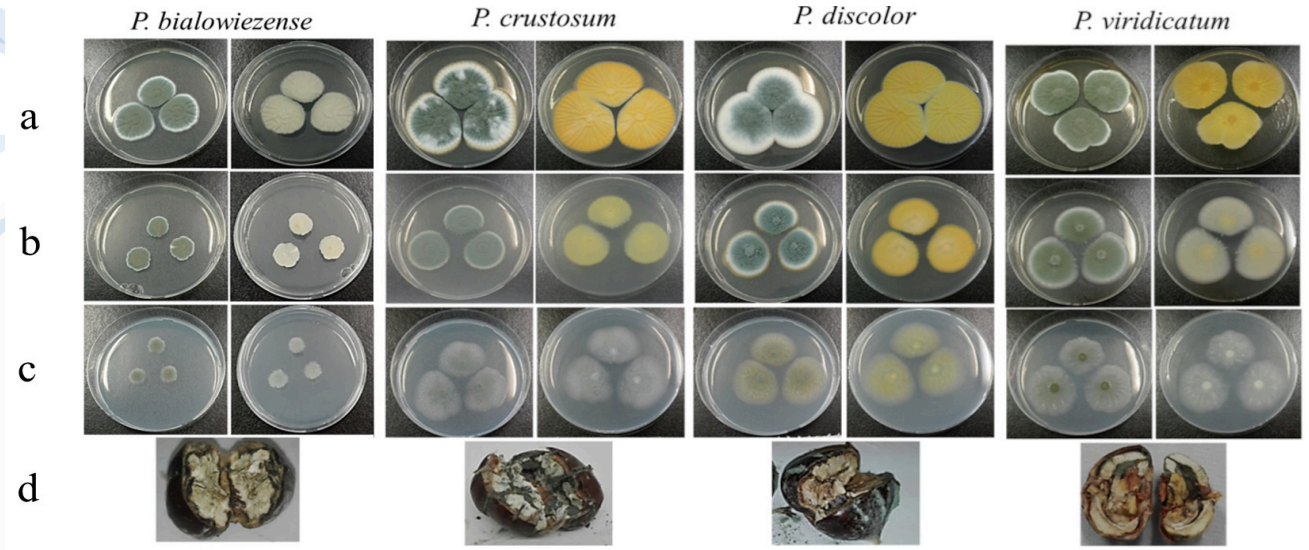


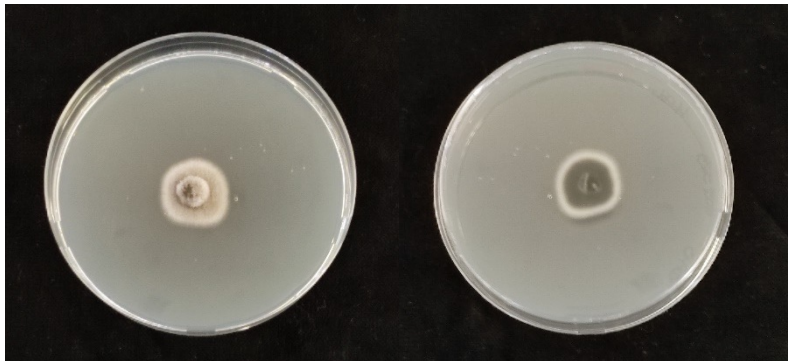
Finanziato dall'Unione europea NextGenerationEU
Ministero dell'Università e della Ricerca
Italiadomani PIANO NAZIONALE DI RIPRESA E RESILIENZA
SUS-MIRRI.IT

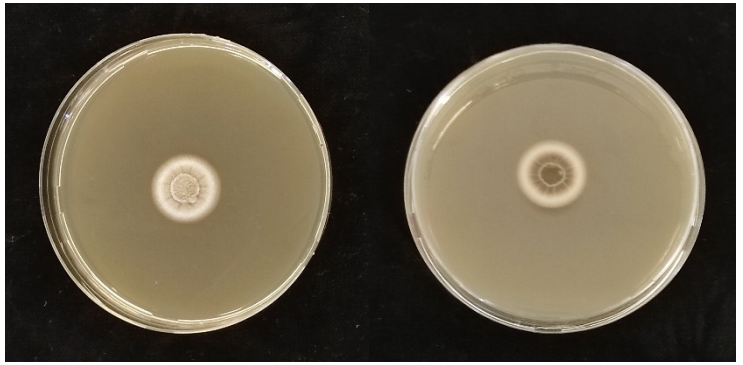
Identificazione morfologica

Osservazione della colonia

- Includo diversi terreni di coltura
- Osservo lo sviluppo della colonia
- Ricerca in letteratura scientifica



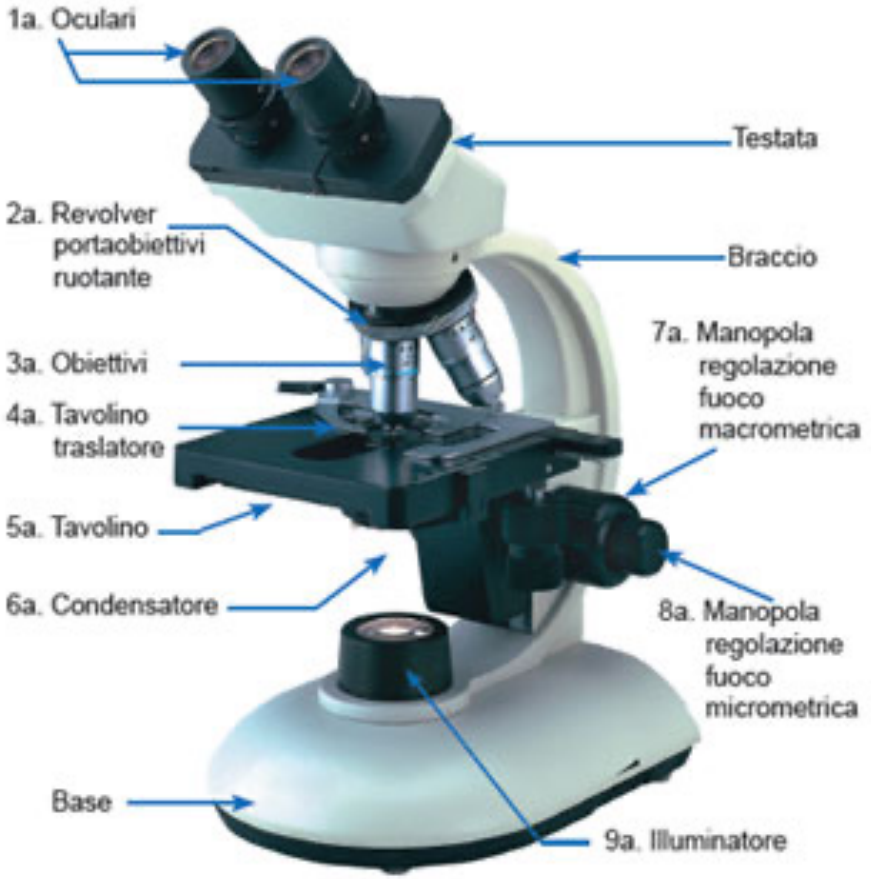




Chiavi dicotomiche per identificazione patogeni

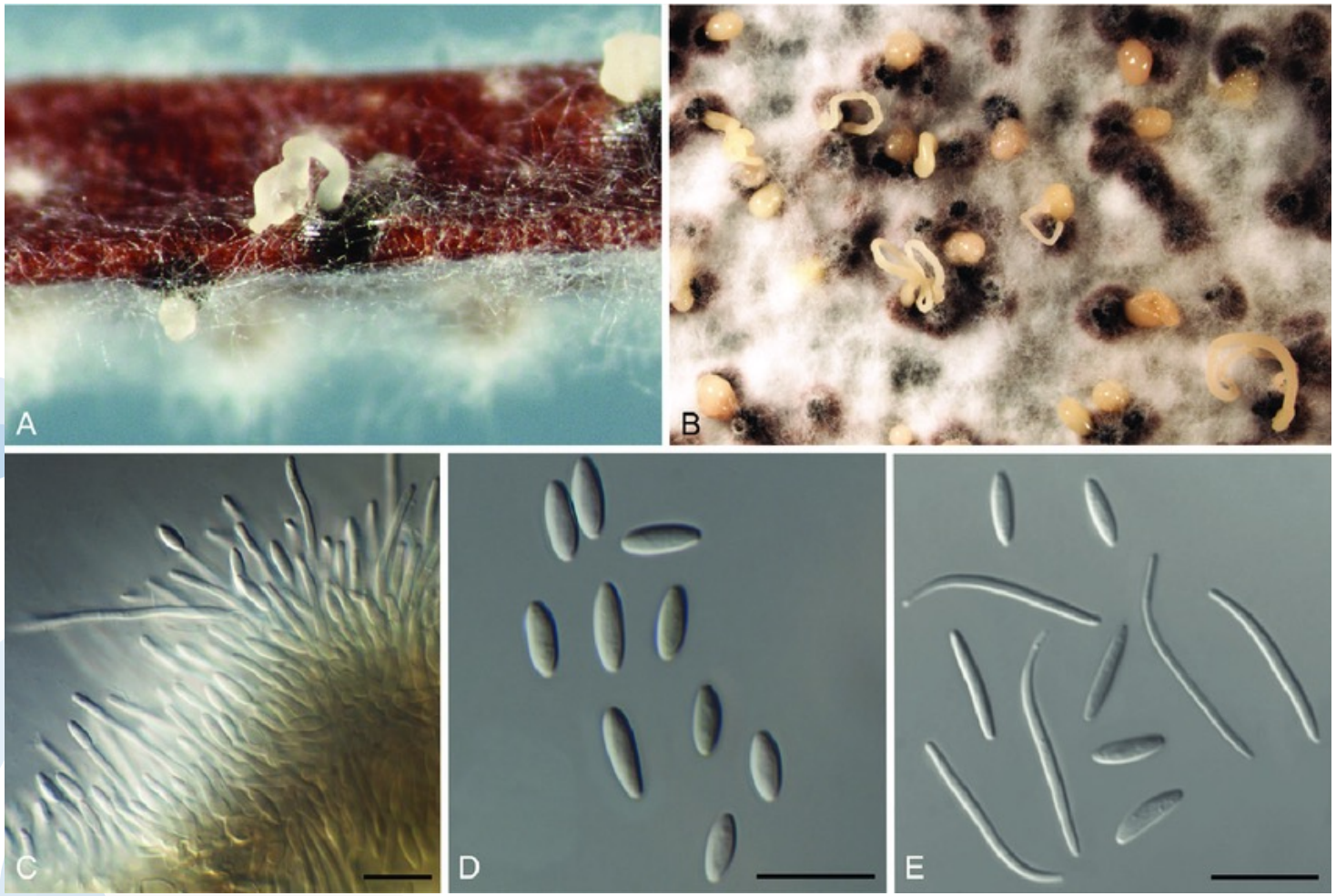
Finanziato dall'Unione europea NextGenerationEU
Ministero dell'Università e della Ricerca
Italiadomani PIANO NAZIONALE DI RIPRESA E RESILIENZA
SUS-MIRRI.IT

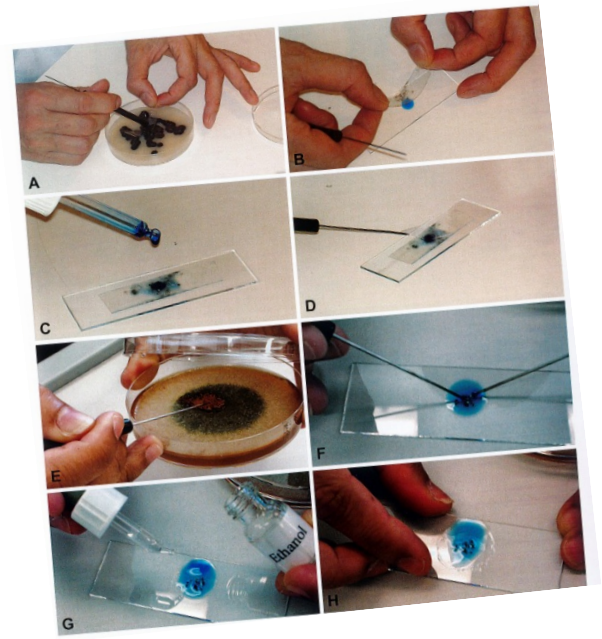
Identificazione morfologica



Finanziato dall'Unione europea NextGenerationEU
Ministero dell'Università e della Ricerca
Italiadomani PIANO NAZIONALE DI RIPRESA E RESILIENZA
SUS-MIRRI.IT

Identificazione morfologica



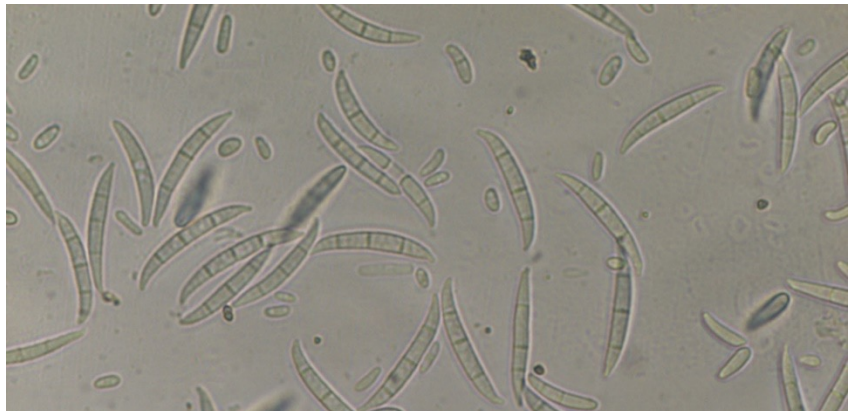


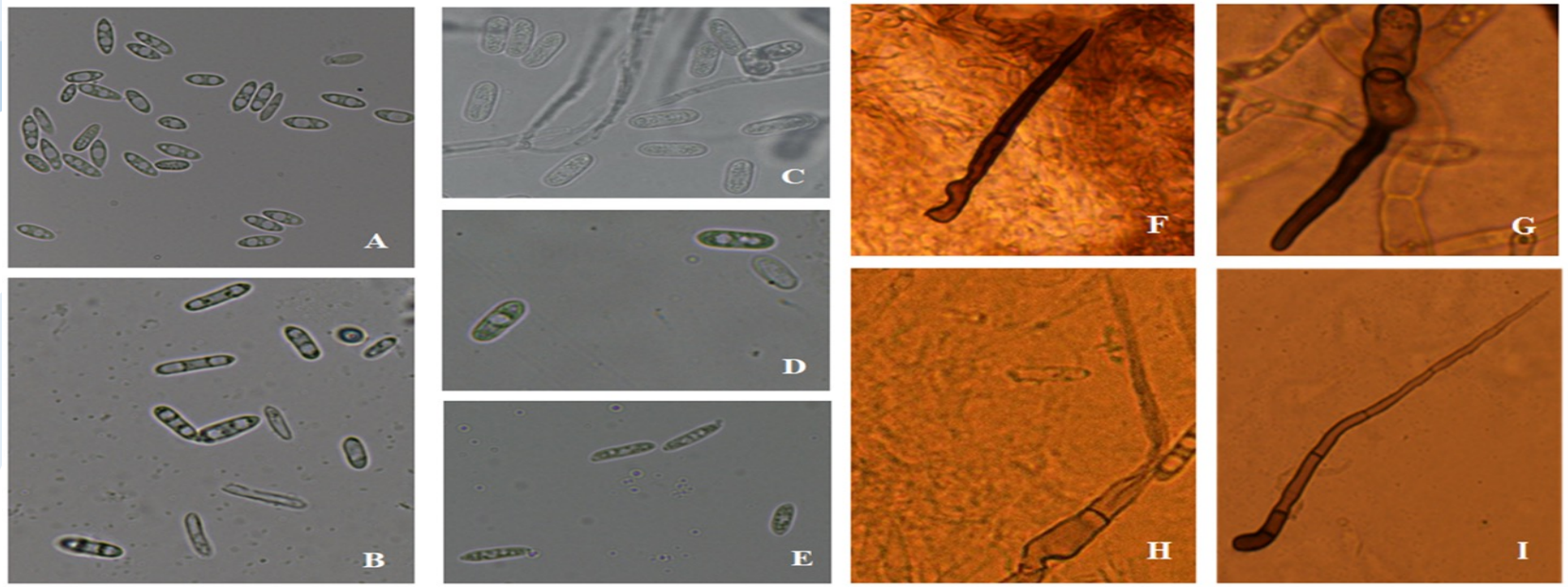
Osservazione delle strutture del patogeno

Chiavi dicotomiche per identificazione patogeni

Finanziato dall'Unione europea NextGenerationEU
Ministero dell'Università e della Ricerca
Italiadomani PIANO NAZIONALE DI RIPRESA E RESILIENZA
SUS-MIRRI.IT

Identificazione morfologica





Osservazione delle strutture del patogeno

Chiavi dicotomiche per identificazione patogeni

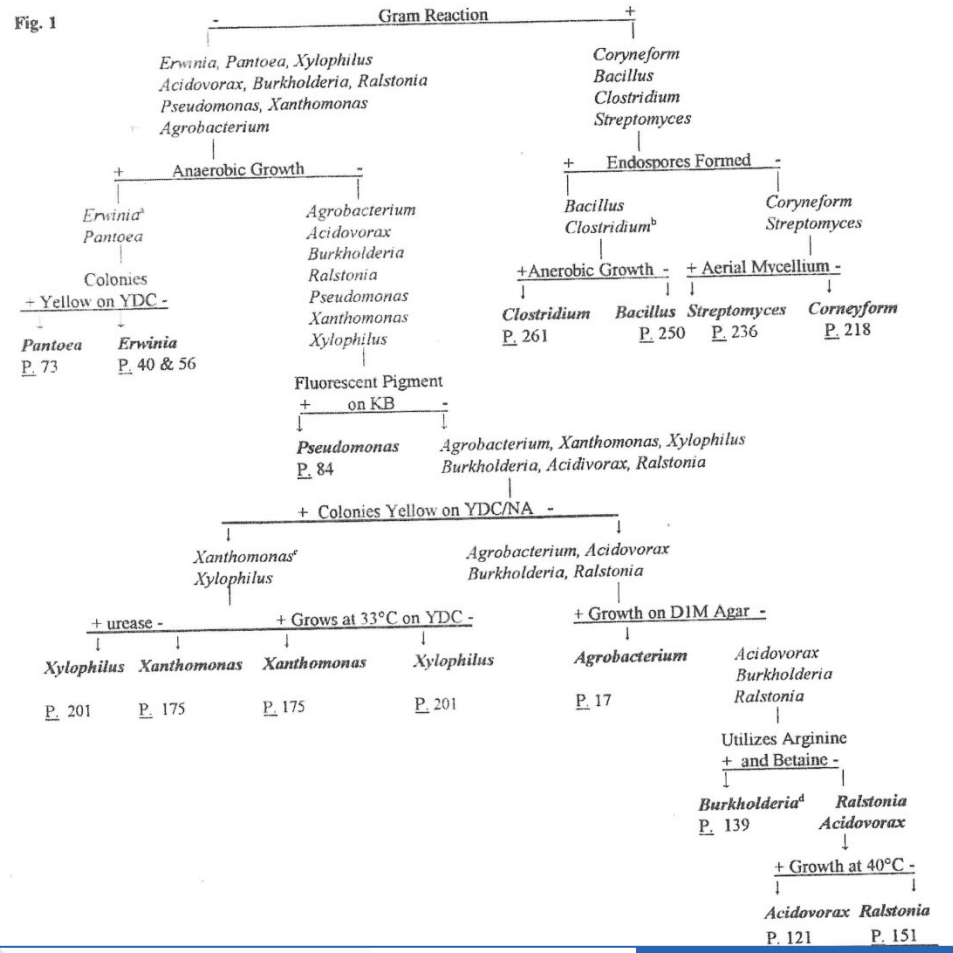
Finanziato dall'Unione europea NextGenerationEU
Ministero dell'Università e della Ricerca
Italiadomani PIANO NAZIONALE DI RIPRESA E RESILIENZA
SUS-MIRRI.IT

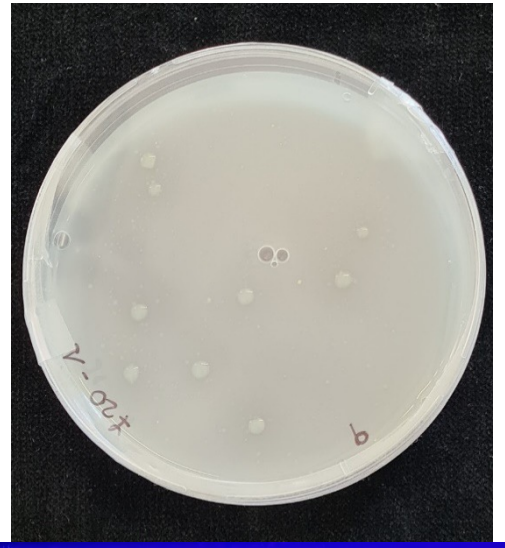
Identificazione morfologica

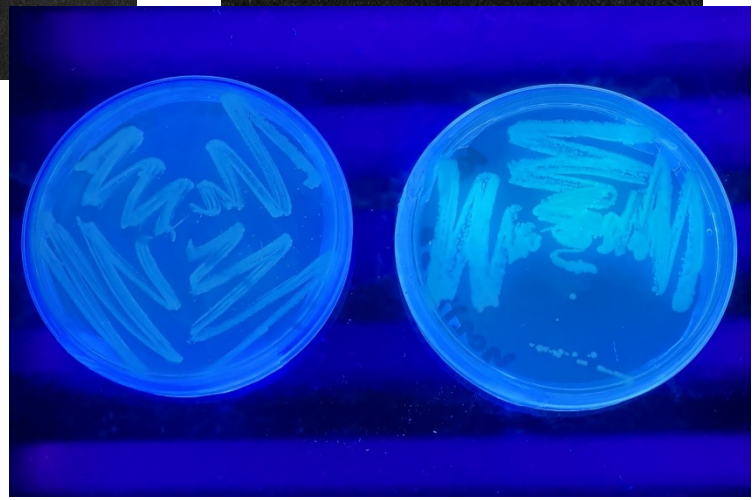
C. DIFFERENTIATION OF COMMONLY ISOLATED GENERA

The following flow chart (Fig. 1) should be used as a quick guide for identifying a particular species or pathovar.

Fig. 1







Chiavi dicotomiche per identificazione patogeni

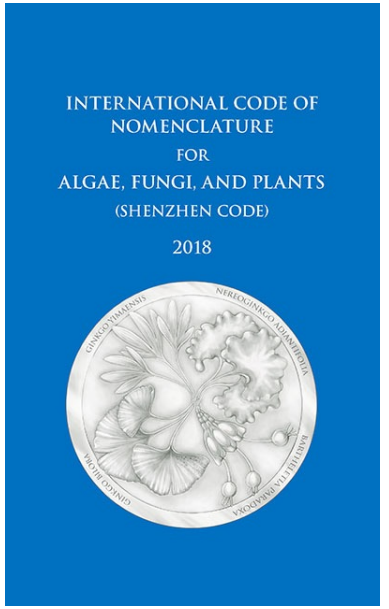
Finanziato dall'Unione europea NextGenerationEU
Ministero dell'Università e della Ricerca
Italiadomani PIANO NAZIONALE DI RIPRESA E RESILIENZA
SUS-MIRRI.IT

Identificazione ecologica - specializzazione

Forma specialis :
è un raggruppamento tassonomico consentito dal Codice internazionale di nomenclatura delle alghe, dei funghi e delle piante, che si applica a un parassita (più spesso un fungo) che si è **adattato a un ospite specifico** (non devono esistere caratteristiche morfologiche differenze o queste devono essere minime)

Razza fisiologica :
Una *forma specialis* è costituita da diversi individui, alcuni dei quali sono in grado di causare malattia su certe cv. ma non su altre della stessa specie vegetale. In questo caso indichiamo queste entità come razze fisiologiche.

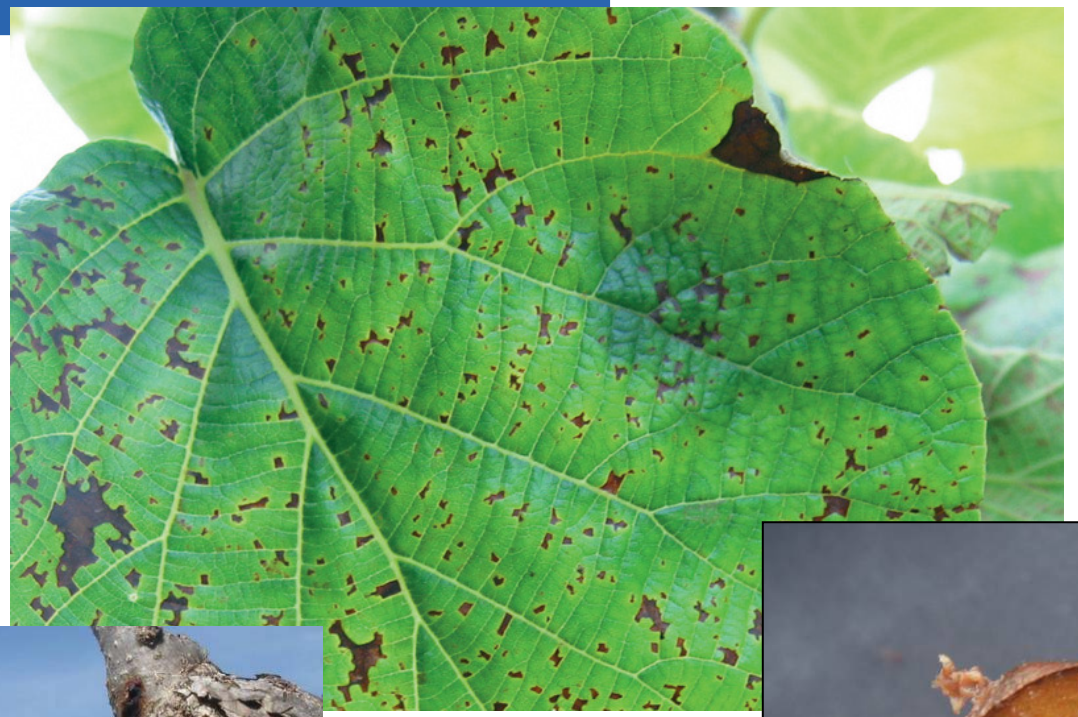
Fusarium oxysporum:
106 *formae speciales*



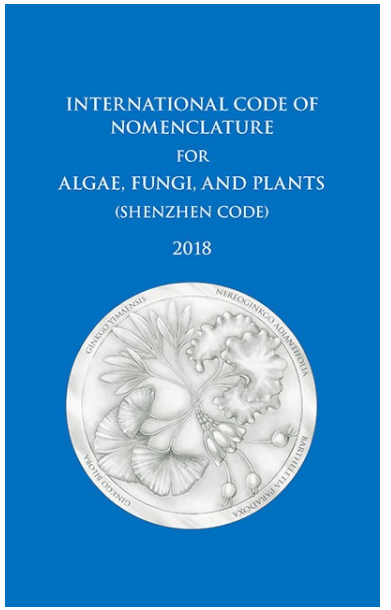
Finanziato dall'Unione europea NextGenerationEU
Ministero dell'Università e della Ricerca
Italiadomani PIANO NAZIONALE DI RIPRESA E RESILIENZA
SUS-MIRRI.IT

Identificazione ecologica - specializzazione

Pathovar :
è un ceppo batterico o un insieme di ceppi con caratteristiche uguali o simili, che si differenzia a livello infrasubspecifico da altri ceppi della stessa specie o sottospecie sulla base della **patogenicità distintiva per una o più piante ospiti**

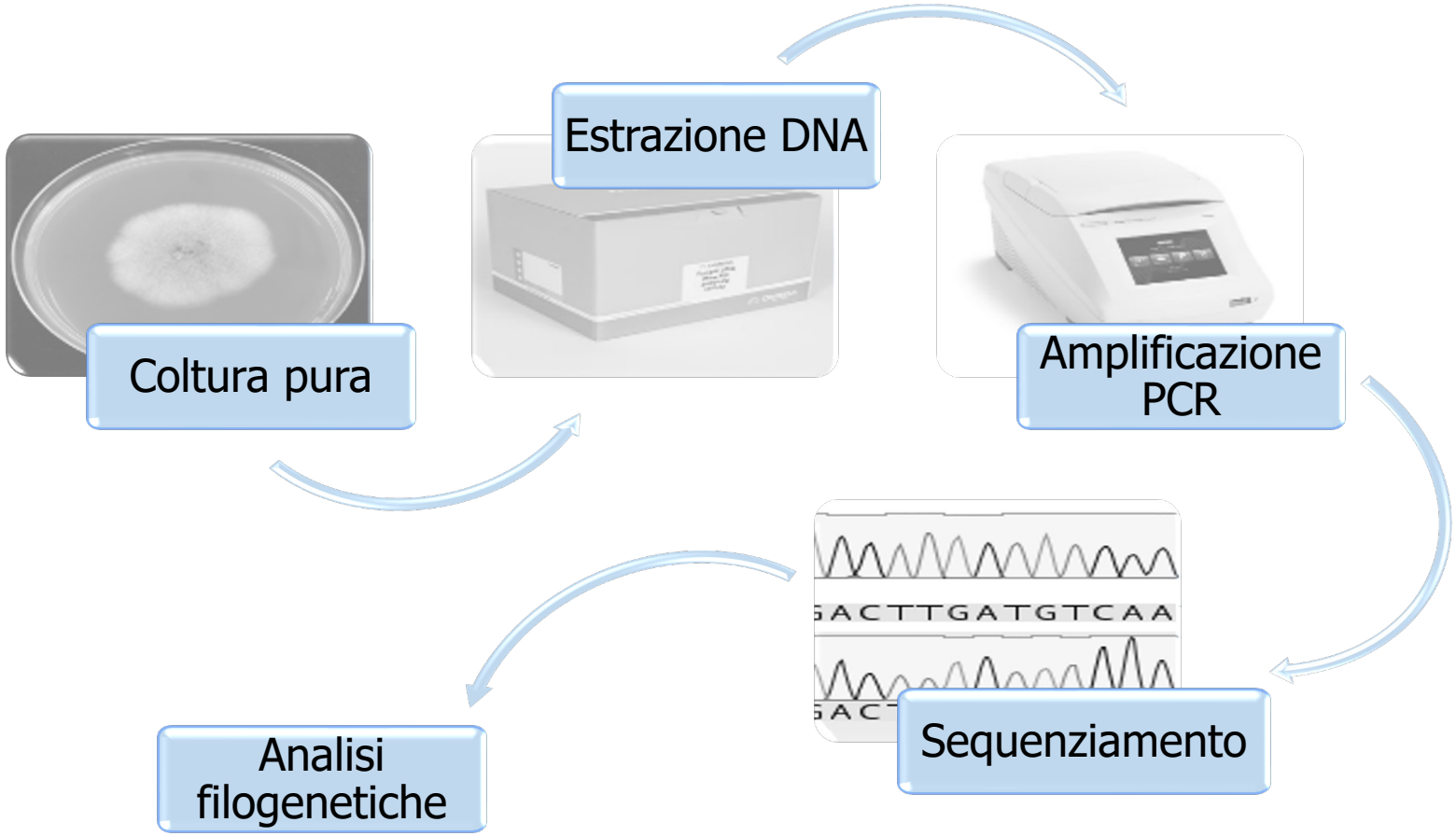


Pseudomonas syringae pv. *actinidiae*



Finanziato dall'Unione europea NextGenerationEU
Ministero dell'Università e della Ricerca
Italiadomani PIANO NAZIONALE DI RIPRESA E RESILIENZA
SUS-MIRRI.IT

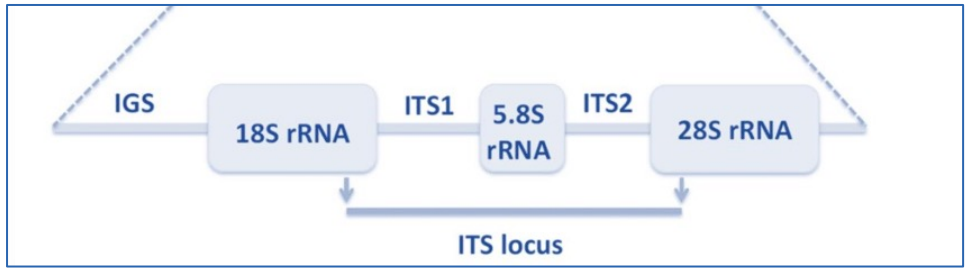
Identificazione molecolare e filogenesi

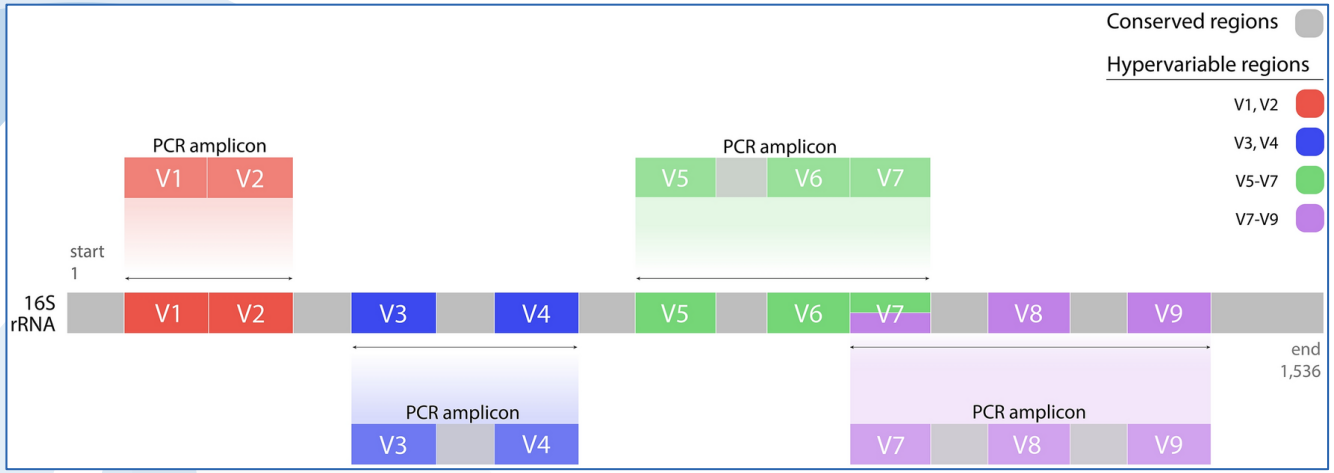


Finanziato dall'Unione europea NextGenerationEU
Ministero dell'Università e della Ricerca
Italiadomani PIANO NAZIONALE DI RIPRESA E RESILIENZA
SUS-MIRRI.IT

Identificazione molecolare e filogenesi

Ricerca in letteratura scientifica





ONE FUNGUS: WHICH GENE?

DNA barcoding uses standardised 500–800 base pair (bp) sequences to identify species of fungi. The absence of a universally accepted DNA barcode for *Fungi* was addressed by Schoch *et al.* (2012), who designated the ITS rDNA as official barcode. However, based on ITS it was only possible to accurately identify around 73 % of the species tested. Therefore, in a subsequent study, Stielow *et al.* (2015) proposed several additional secondary barcodes, to be used in conjunction with ITS. Slowly evolving genes (*e.g. tef1*, *rpb2* exons) were shown to be more suitable for inference of deep phylogenetic relationships, while genes with higher evolutionary rates (*e.g.* ITS, *tub2*) reflected more recent evolutionary and speciation events. Based on the results of Stielow *et al.* (2015), translation elongation factor 1-α appeared to be one of the most ideal candidate genes to consider as secondary barcode. For published primer sequences, see Stielow *et al.* (2015).

Finanziato dall'Unione europea NextGenerationEU
Ministero dell'Università e della Ricerca
Italiadomani PIANO NAZIONALE DI RIPRESA E RESILIENZA
SUS-MIRRI.IT

Identificazione molecolare e filogenesi

- Ottenimento sequenze fw - rev
- Ricerca in letteratura di sequenze di riferimento

Importante: qualità della sequenze

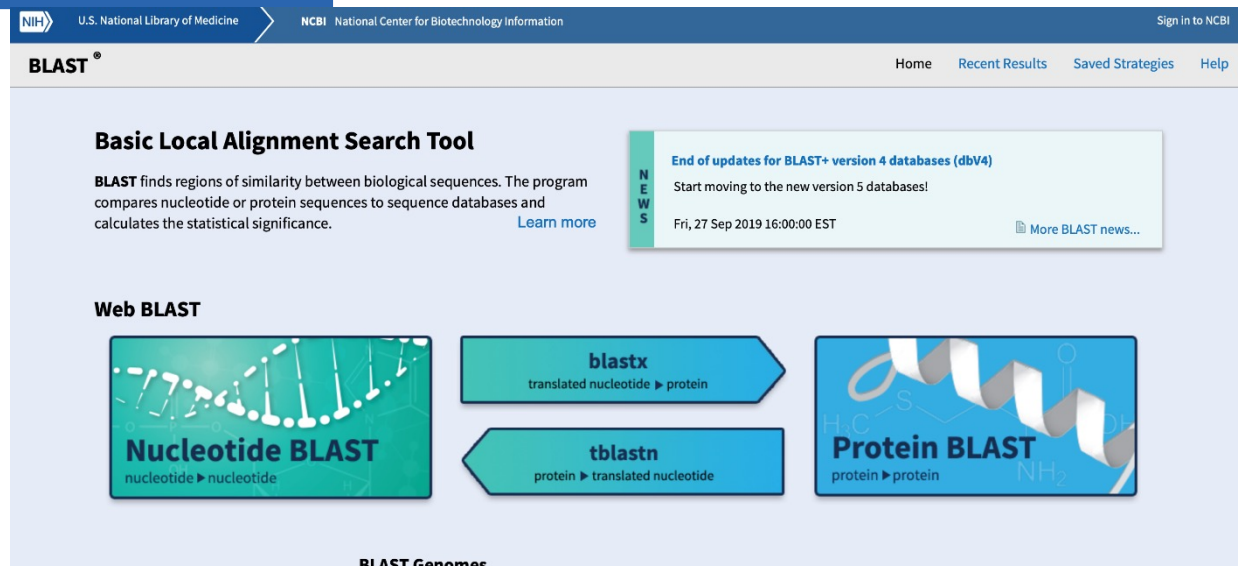
- Sequenzio in fw e rev
- Controllo i nucleotidi sui cromatogrammi di entrambi i filamenti
- Inserisco una «N» se sono incerta su quale nucleotide sia corretto

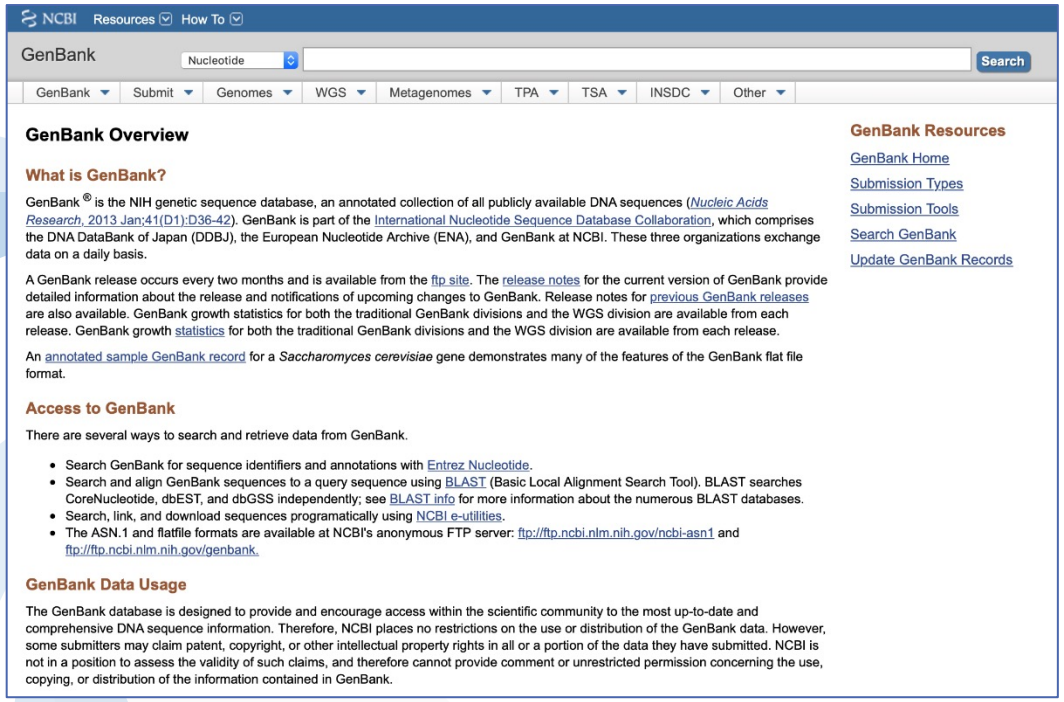
> The purpose of sequencing is to determine the order of the nucleotides of a given piece of DNA. For sequencing, we normally do not start from gDNA (like for a PCR) but mostly from PCR fragments or plasmids (in the

Finanziato dall'Unione europea NextGenerationEU
Ministero dell'Università e della Ricerca
Italiadomani PIANO NAZIONALE DI RIPRESA E RESILIENZA
SUS-MIRRI.IT

Identificazione molecolare e filogenesi

- Ottenimento sequenze fw - rev
- Ricerca in letteratura di sequenze di riferimento





The easiest format in which to distribute nucleotide sequences is called the FASTA format. A sequence in FASTA format consists of two parts, the first being a description or title line and the second is the nucleotide sequence data itself. The description or title line is distinguished from the sequence data by a greater-

Finanziato dall'Unione europea NextGenerationEU
Ministero dell'Università e della Ricerca
Italiadomani PIANO NAZIONALE DI RIPRESA E RESILIENZA
SUS-MIRRI.IT

Identificazione molecolare e filogenesi

Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s) Clear

>Colletotrichum hystricis strain CPC 28153 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
AGGGATCATTACTGAGTTTACGCTCTATAACCCTTTGTGAACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTA
GGGTCTCCGTGACCCTCCCGGTCTCCCGCCCCCGGGCGGGTCGGCGCCCGCCGGAGGATAACCAAACT
CT
GATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAAATAATCAAAACTTTTAACAACGGATCTCTTGGTTC
TGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAAT
CTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAA
GCTCTGCTTGGTGTTGGGGCGCTACAGCTGATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGACCCTCCCGGAGC

Or, upload file Choose File no file selected

Job Title Colletotrichum hystricis strain CPC 28153...

Enter a descriptive title for your BLAST search

Align two or more sequences

Choose Search Set

Database Human genomic + transcript | Mouse genomic + transcript | Others (nr etc.):

Nucleotide collection (nr/nt)

Organism Optional

Enter organism name or id--completions will be suggested exclude +

Enter organism common name, binomial, or tax id. Only 20 top taxa will be shown

Exclude Optional

Models (XM/XP) Uncultured/environmental sample sequences

Limit to Optional

Sequences from type material

Entrez Query Optional

YouTube Create custom database

Enter an Entrez query to limit search

Program Selection

Optimize for

Highly similar sequences (megablast)

More dissimilar sequences (discontiguous megablast)

Somewhat similar sequences (blastn)

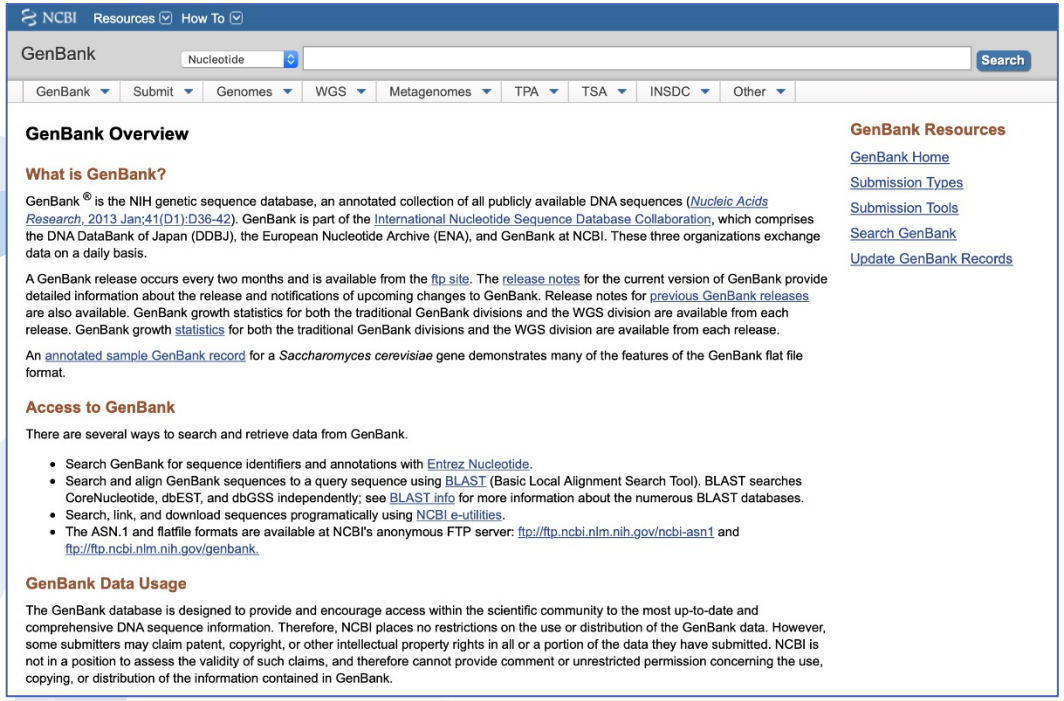
Choose a BLAST algorithm

Colletotrichum hystricis CBS 142411 ITS region; from TYPE material	950	950	100%	0.0	100.00%	NR_152311.1
Colletotrichum hystricis strain CPC 28153 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, ar	950	950	100%	0.0	100.00%	KY856450.1
Colletotrichum gloeosporioides voucher HY11 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal	939	939	100%	0.0	99.61%	MK514508.1
Colletotrichum gloeosporioides strain FRAH12 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed	939	939	100%	0.0	99.61%	MK467538.1
Colletotrichum gloeosporioides strain FRAH09 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal	939	939	100%	0.0	99.61%	MK426765.1
Colletotrichum gloeosporioides strain FRAH04 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal	939	939	100%	0.0	99.61%	MK111074.1
Colletotrichum alienum isolate LWU_23 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA g	939	939	100%	0.0	99.61%	MK299123.1
Colletotrichum gloeosporioides isolate CS009 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal	939	939	100%	0.0	99.61%	MK215693.1
Colletotrichum gloeosporioides isolate CS007 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal	939	939	100%	0.0	99.61%	MK215691.1
Colletotrichum gloeosporioides isolate CS004 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal	939	939	100%	0.0	99.61%	MK212350.1
Colletotrichum tropicale genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial and complete sequence, strain: JM1	939	939	100%	0.0	99.61%	LC224298.1
Colletotrichum siamense isolate COUFAL0200 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal	939	939	100%	0.0	99.61%	MH151143.1
Colletotrichum siamense isolate SC4-3 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and	939	939	100%	0.0	99.61%	MH636473.1
Colletotrichum siamense clone EIPP 77 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA c	939	939	100%	0.0	99.61%	MK330037.1
Colletotrichum siamense clone EIPP 2 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA ge	939	939	100%	0.0	99.61%	MK330034.1
Colletotrichum alienum isolate RS_100 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA g	939	939	100%	0.0	99.61%	MK379590.1
Colletotrichum sp. strain LGMF1510 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA c	939	939	100%	0.0	99.61%	MG976332.1
Colletotrichum siamense strain yc19 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene	939	939	100%	0.0	99.61%	MF540884.1
Colletotrichum gloeosporioides isolate NAS-CG7 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosom	939	939	100%	0.0	99.61%	MH168111.1
Colletotrichum alienum isolate GA524 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and ir	939	939	100%	0.0	99.61%	KX620332.1
Colletotrichum gloeosporioides isolate A27 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RN	939	939	100%	0.0	99.61%	KY962996.1
Colletotrichum sp. ETHCTR032 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal	939	939	100%	0.0	99.61%	KT282656.1
Colletotrichum gloeosporioides strain F211156 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gen	939	939	100%	0.0	99.61%	KX197384.1

Finanziato dall'Unione europea NextGenerationEU
Ministero dell'Università e della Ricerca
Italiadomani PIANO NAZIONALE DI RIPRESA E RESILIENZA
SUS-MIRRI.IT

Identificazione molecolare e filogenesi

- Ottenimento sequenze fw - rev
- Ricerca in letteratura di sequenze di riferimento



NCBI Resources How To

GenBank Nucleotide Search

GenBank Submit Genomes WGS Metagenomes TPA TSA INSDC Other

GenBank Overview

What is GenBank?

GenBank ® is the NIH genetic sequence database, an annotated collection of all publicly available DNA sequences (*Nucleic Acids Research*, 2013 Jan;41(D1):D36-42). GenBank is part of the International Nucleotide Sequence Database Collaboration, which comprises the DNA DataBank of Japan (DDBJ), the European Nucleotide Archive (ENA), and GenBank at NCBI. These three organizations exchange data on a daily basis.

A GenBank release occurs every two months and is available from the ftp site. The release notes for the current version of GenBank provide detailed information about the release and notifications of upcoming changes to GenBank. Release notes for previous GenBank releases are also available. GenBank growth statistics for both the traditional GenBank divisions and the WGS division are available from each release. GenBank growth statistics for both the traditional GenBank divisions and the WGS division are available from each release.

An annotated sample GenBank record for a *Saccharomyces cerevisiae* gene demonstrates many of the features of the GenBank flat file format.

Access to GenBank

There are several ways to search and retrieve data from GenBank.

- Search GenBank for sequence identifiers and annotations with Entrez Nucleotide.
- Search and align GenBank sequences to a query sequence using BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). BLAST searches CoreNucleotide, dbEST, and dbGSS independently; see BLAST info for more information about the numerous BLAST databases.
- Search, link, and download sequences programatically using NCBI e-utilities.
- The ASN.1 and flatfile formats are available at NCBI's anonymous FTP server: ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/ncbi-asn1 and ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genbank.

GenBank Data Usage

The GenBank database is designed to provide and encourage access within the scientific community to the most up-to-date and comprehensive DNA sequence information. Therefore, NCBI places no restrictions on the use or distribution of the GenBank data. However, some submitters may claim patent, copyright, or other intellectual property rights in all or a portion of the data they have submitted. NCBI is not in a position to assess the validity of such claims, and therefore cannot provide comment or unrestricted permission concerning the use, copying, or distribution of the information contained in GenBank.

GenBank Resources

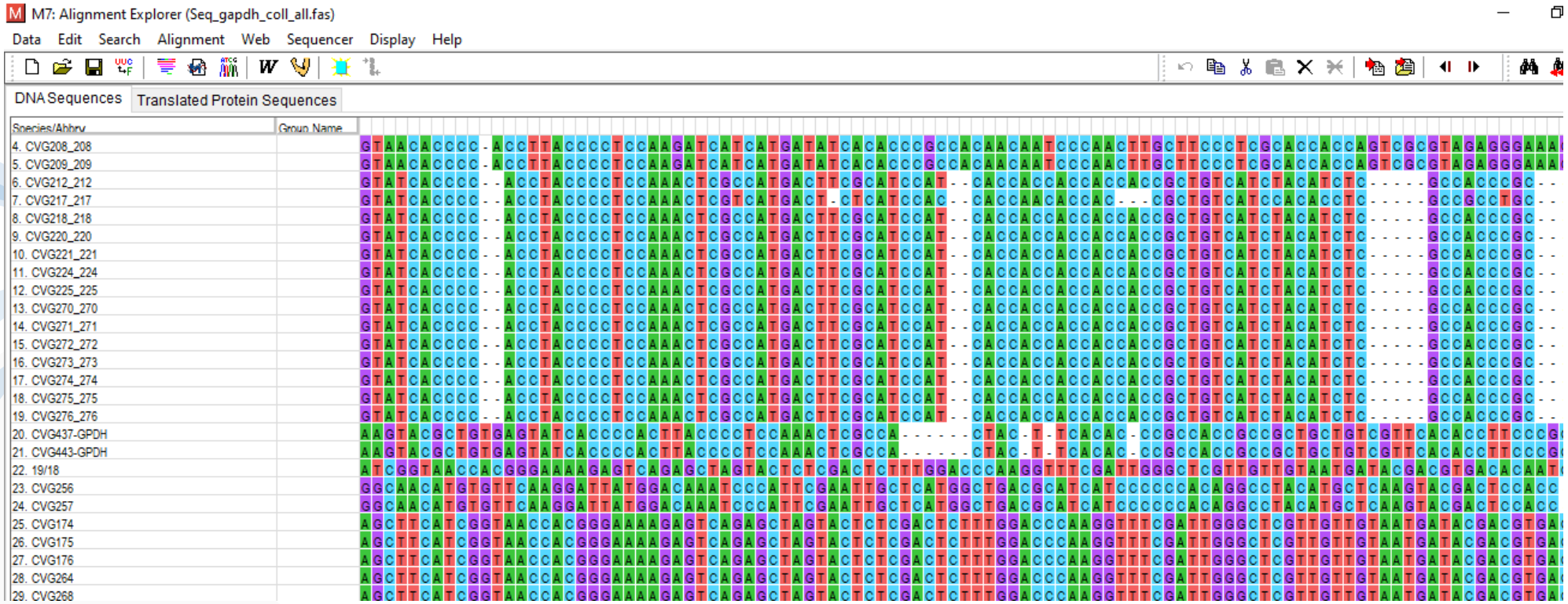
GenBank Home
Submission Types
Submission Tools
Search GenBank
Update GenBank Records

C. gloeosporioides (cont.)	CPC 27939	*Citrus limon*	Portugal, Faro	Leaf lesion	*KY856430*	*KY856254*
	CPC 27941	*Citrus sinensis*	Portugal, Silves	Twigs wither-tip	*KY856431*	*KY856255*
	CPC 27971	*Citrus sinensis* 'Valencia'	Portugal, Mesquita	Fruit lesion	*KY856432*	*KY856256*
	CPC 27991	*Citrus sinensis* 'Valencia'	Portugal, Mesquita	Fruit tear stain	*KY856433*	*KY856257*
	CPC 28001	*Citrus paradisi*	Portugal, Faro	Leaf lesion	*KY856434*	*KY856258*
	CPC 28021	*Citrus sinensis*	Portugal, Mesquita	Twigs wither-tip	*KY856435*	*KY856259*
	CPC 28023	*Citrus limon*	Portugal, Monchique	Leaf lesion	*KY856436*	*KY856260*
	CPC 28029	*Citrus sinensis*	Portugal, Silves	Twigs wither-tip	*KY856437*	*KY856261*
	CPC 28052	*Citrus reticulata*	Spain, Algemesi	Twigs wither-tip	*KY856438*	*KY856262*
	CPC 28056	*Citrus sinensis* 'Lanelate'	Spain, Moncada	Petal lesions	*KY856439*	*KY856263*
	CPC 28061	*Citrus sinensis*	Spain, Castellò	Leaf lesion	*KY856440*	*KY856264*
	CPC 28063	*Citrus sinensis*	Spain, Castellò	Leaf lesion	*KY856441*	*KY856265*
	CPC 28155	*Citrus floridana*	Italy, Catania	Fruit lesion	*KY856442*	*KY856266*
	CPC 28159	*Citrus digitata*	Italy, Catania	Leaf lesion	*KY856443*	*KY856267*
	CPC 28196	*Atlantia citroides*	Spain, Soller	Leaf lesion	*KY856444*	*KY856268*
	CPC 28197	*Microcitrus australasica*	Spain, Soller	Twigs wither-tip	*KY856445*	*KY856269*
	ICMP 12938	*Citrus sinensis*	New Zealand	–	JX010147	JX009935
	ICMP 18695	*Citrus* sp.	USA	–	JX010153	JX009979
	ICMP 18730	*Citrus* sp.	New Zealand	–	JX010157	JX009981
	ICMP 18738	*Carya illinoinensis*	Australia	–	JX010151	JX009976
C. godetiae	**CBS 133.44**	*Clarkia hybrida*	Denmark	–	JQ948402	JQ948733
C. helleniense	**CBS 142418 = CPC 26844**	*Poncirus trifoliata*	Greece, Arta	Twigs wither-tip	*KY856446*	*KY856270*
	CBS 142419 = CPC 27107	*Citrus reticulata*	Greece, Arta	Fruit lesion	*KY856447*	*KY856271*
	CPC 26845	*Poncirus trifoliata*	Greece, Arta	Twigs wither-tip	*KY856448*	*KY856272*
	CPC 27108	*Citrus reticulata*	Greece, Arta	Fruit lesion	*KY856449*	*KY856273*
C. hystricis	**CBS 142411 = CPC 28153**	*Citrus hystrix*	Italy, Catania	Leaf lesion	*KY856450*	*KY856274*
	CBS 142412 = CPC 28154	*Citrus hystrix*	Italy, Catania	Leaf lesion	*KY856451*	*KY856275*
C. johnstonii	**CBS 128532**	*Citrus* sp.	New Zealand	–	JQ948443	JQ948774
C. kahawae subsp. *kahawae*	**ICMP 17816**	*Coffea arabica*	Kenya	–	JX010231	JX010012
C. kahawae subsp. *ciggaro*	**ICMP 18539**	*Olea europaea*	Australia	–	JX010230	JX009966
C. karstii	CBS 126532	*Citrus* sp.	South Africa	–	JQ005209	JQ005296
	CBS 127597	*Diospyros australis*	Australia	–	JQ005204	JQ005291
	CBS 128551	*Citrus* sp.	New Zealand	–	JQ005208	JQ005295
	CBS 129829	*Gossypium hirsutum*	Germany	–	JQ005189	JQ005276

Finanziato dall'Unione europea NextGenerationEU
Ministero dell'Università e della Ricerca
Italiadomani PIANO NAZIONALE DI RIPRESA E RESILIENZA
SUS-MIRRI.IT

Identificazione molecolare e filogenesi

- Ricerca in letteratura di sequenze di riferimento
- Allineamento single locus
- Generazione file FASTA

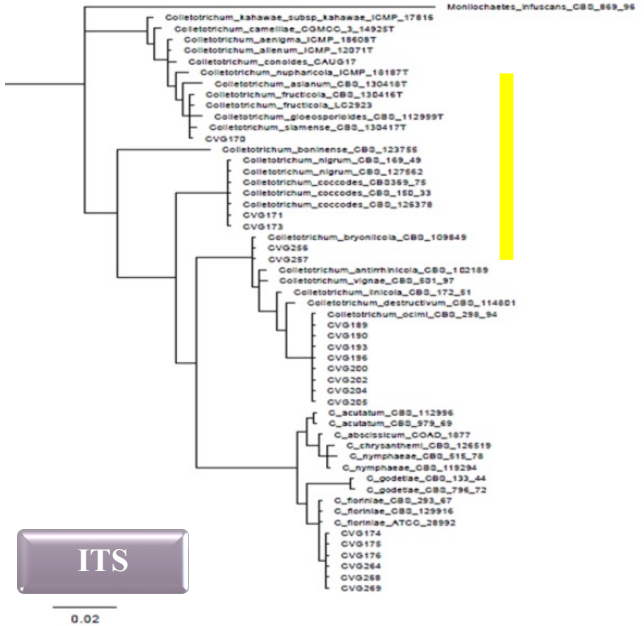


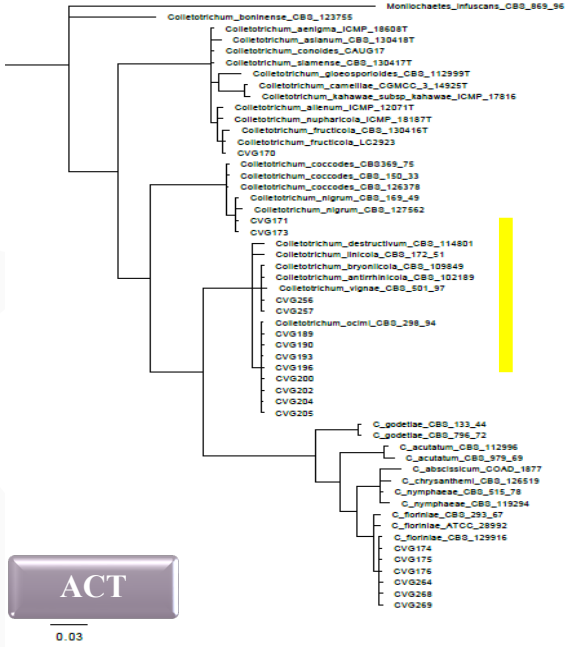
Finanziato dall'Unione europea NextGenerationEU
Ministero dell'Università e della Ricerca
Italiadomani PIANO NAZIONALE DI RIPRESA E RESILIENZA
SUS-MIRRI.IT

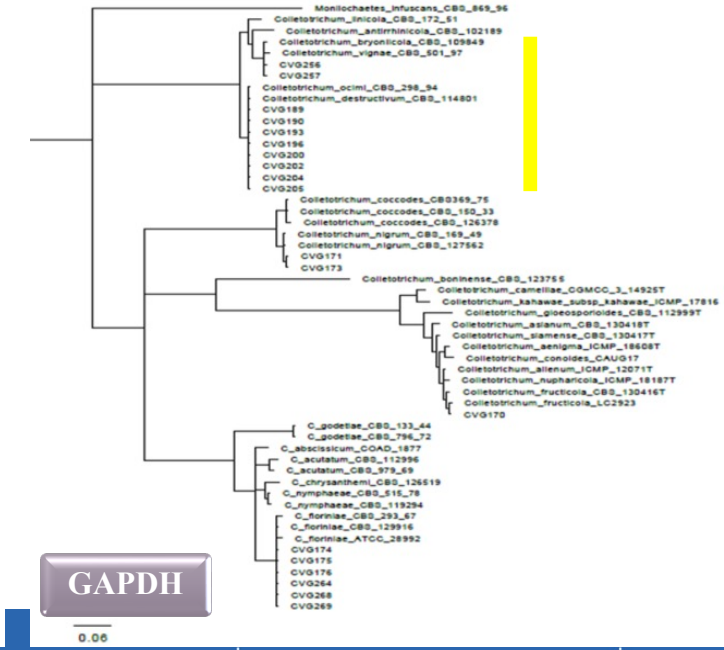
Identificazione molecolare e filogenesi

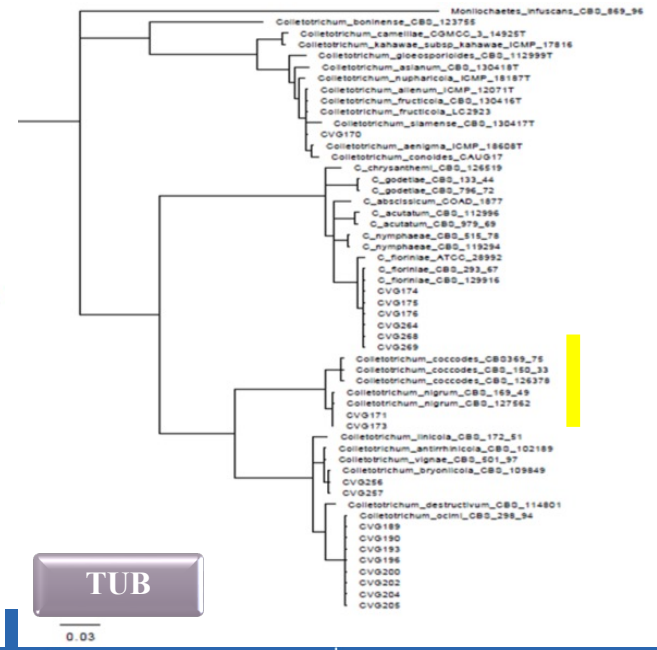
- Generazione file FASTA
- Albero single locus

Talvolta, un singolo locus da solo non consenti di discriminare le specie









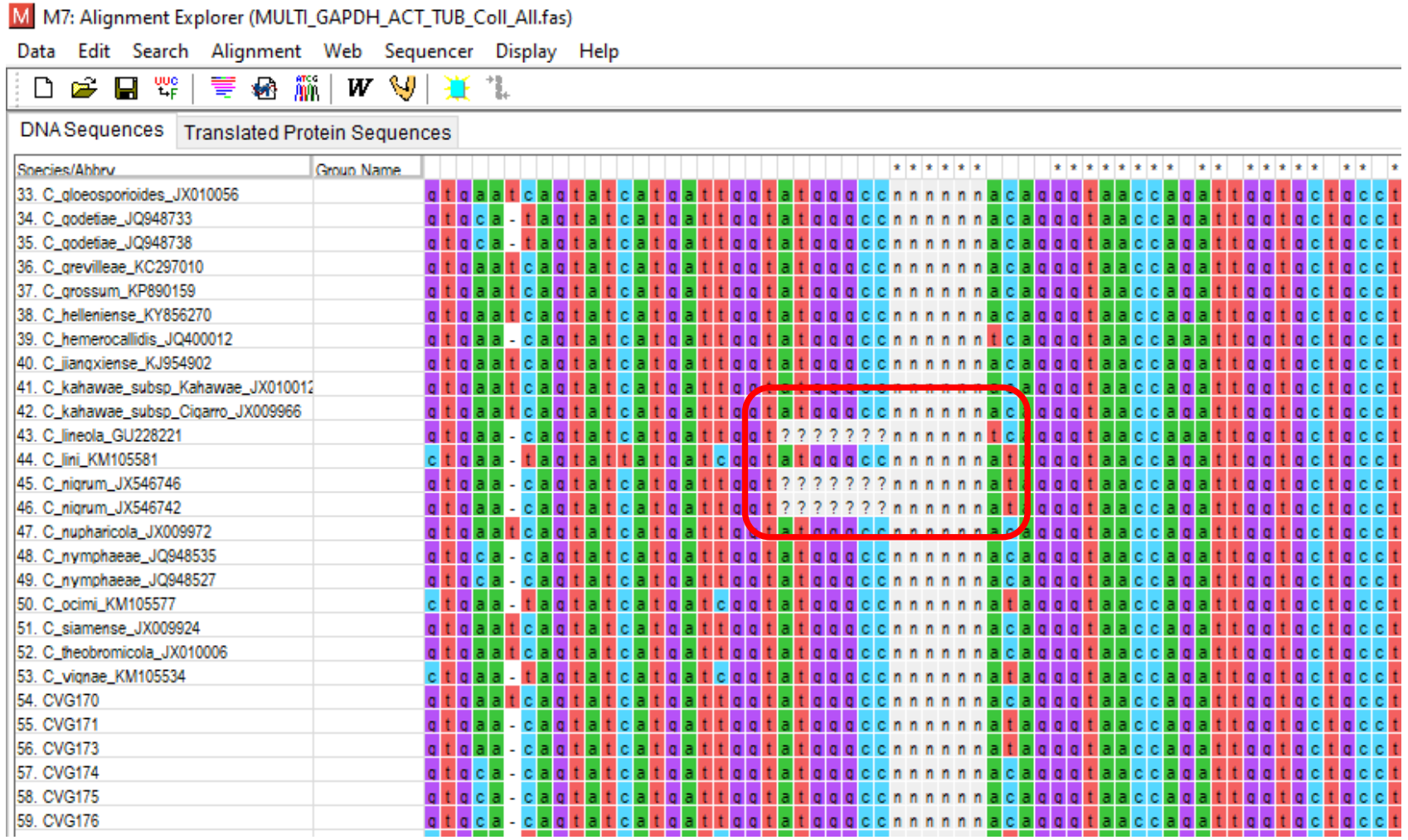
Finanziato dall'Unione europea NextGenerationEU
Ministero dell'Università e della Ricerca
Italiadomani PIANO NAZIONALE DI RIPRESA E RESILIENZA
SUS-MIRRI.IT

Identificazione molecolare e filogenesi

- Allineamento multi-locus
- Albero multi-locus

CHARACTER MATRIX

The character or data matrix represents all characters that you want to include in the analysis; it can contain sequence data, morphological data, ecological data, *etc.*, or a combination of these (Inglis 1991). For example, each character in a matrix consisting only of sequence data can be represented by any one of the following character states: one of the four nucleotides, the code representing a variation of two or more nucleotides (see the section on Sequencing earlier in the chapter), a designation for missing data (frequently as a "?" symbol) or a gap (frequently as a "–" symbol). Therefore, each character can have various character states, which can be binary (*e.g.* absent/present, long/short, *etc.*), but also multi-state (*e.g.* different colours, pathogenicity score, *etc.*). A character



Finanziato dall'Unione europea NextGenerationEU
Ministero dell'Università e della Ricerca
Italiadomani PIANO NAZIONALE DI RIPRESA E RESILIENZA
SUS-MIRRI.IT

Identificazione molecolare e filogenesi

- Allineamento multi-locus
- Albero multi-locus

nylander/
MrModeltest2

C program for selecting DNA substitution models using PAUP*

Mr Bayes
Bayesian Inference of Phylogeny

Analisi secondo criterio di massima parsimonia (MP):
l'albero migliore è quello con il minor numero di cambiamenti.

Analisi secondo criterio di distanza (UPGMA e NJ) :
si calcola la distanza tra le sequenze come la somma delle differenze tra le basi e si ottiene una matrice di distanza.

Analisi secondo criterio di massima simiglianza (ML) e inferenza Bayesiana (BI):
si utilizza ogni posizione dell'allineamento per calcolare un albero e si confronta la somiglianza degli alberi utilizzando un modello di evoluzione.

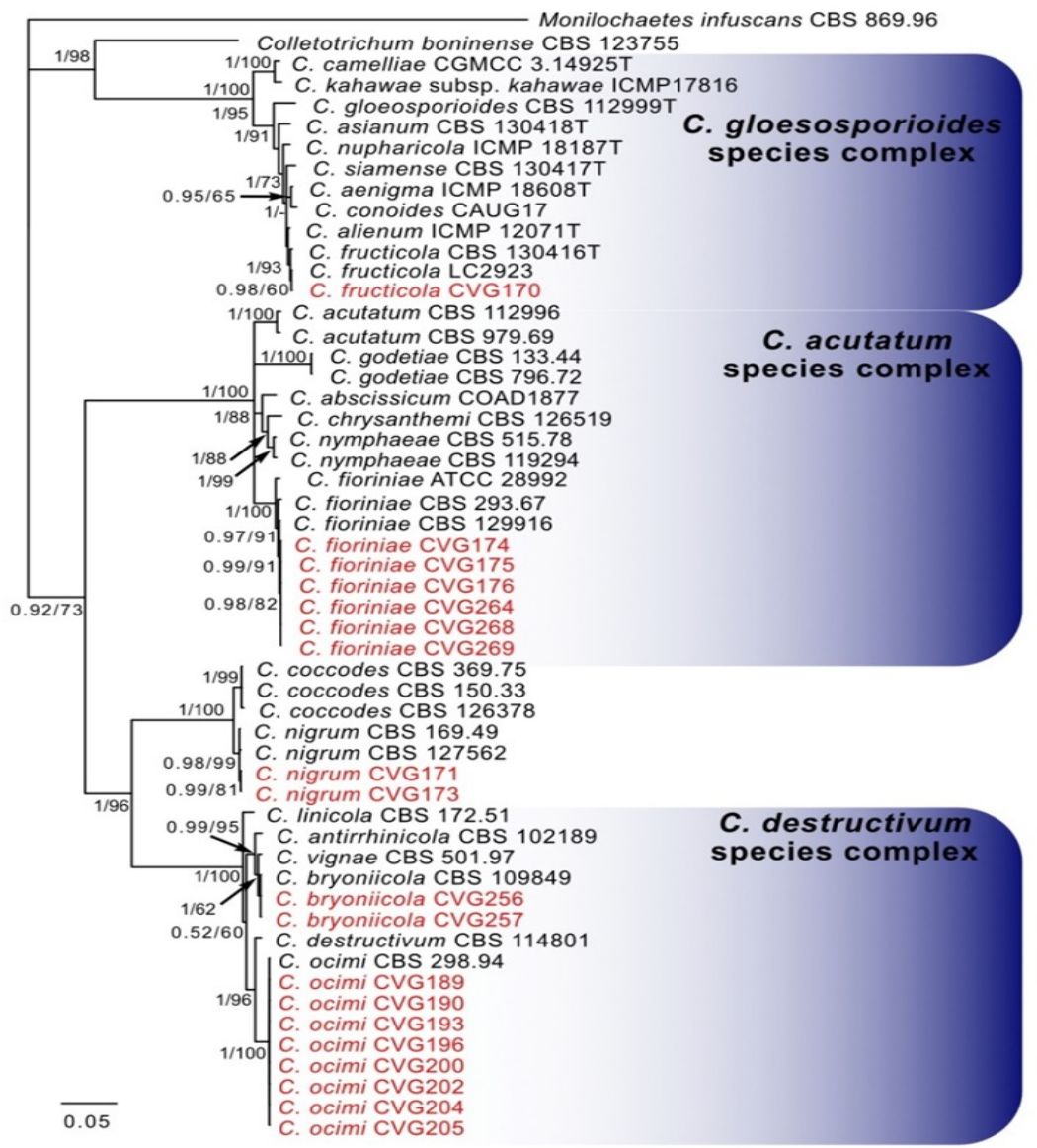
Finanziato dall'Unione europea NextGenerationEU
Ministero dell'Università e della Ricerca
Italiadomani PIANO NAZIONALE DI RIPRESA E RESILIENZA
SUS-MIRRI.IT

Identificazione molecolare e filogenesi

- Allineamento multi-locus
- Albero multi-locus

Con l'aiuto delle sequenze dovrebbe essere possibile trovare i legami genealogici tra gli organismi.

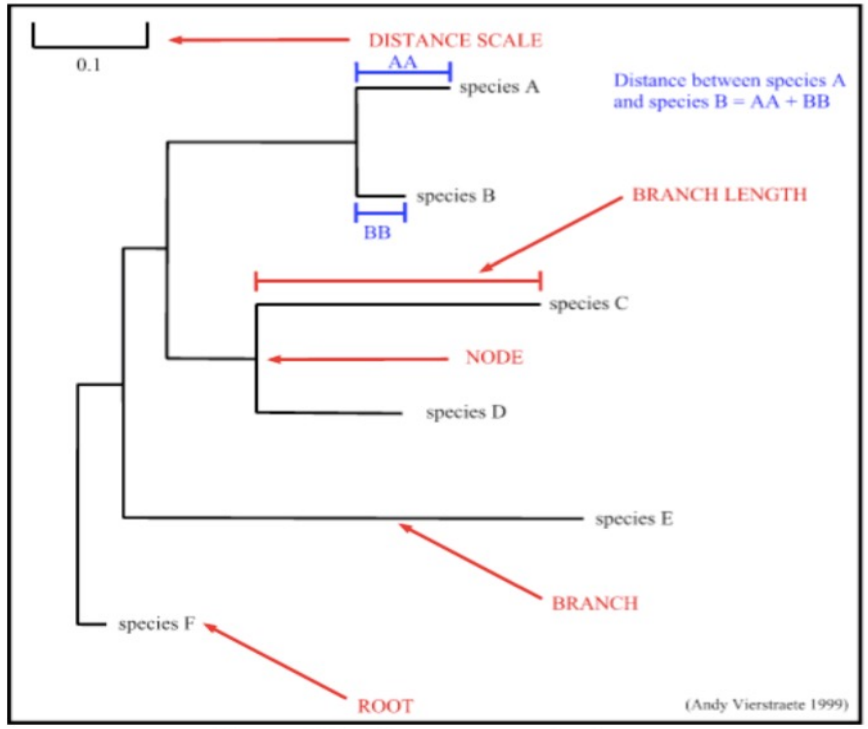
L'esperienza insegna che gli **organismi strettamente imparentati hanno sequenze simili**, mentre gli organismi più distanti hanno sequenze più dissimili. Un obiettivo è ricostruire la relazione evolutiva tra le specie.



Finanziato dall'Unione europea NextGenerationEU
Ministero dell'Università e della Ricerca
Italiadomani PIANO NAZIONALE DI RIPRESA E RESILIENZA
SUS-MIRRI.IT

Identificazione molecolare e filogenesi

- Allineamento multi-locus
- Albero multi-locus



Clade: un cluster di isolati identici o correlati

Taxon: qualsiasi gruppo o rank nella classificazione degli organismi (classe, famiglia, genere, specie)

Nodo: rappresenta un'unità tassonomica

Ramo: definisce la relazione tra gli isolati. La **lunghezza del ramo** indica il numero di cambiamenti avvenuti in quel ramo (MP) o il numero di sostituzioni per sito (NJ)

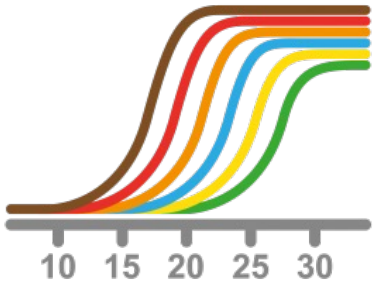
Radice: un ipotetico antenato di tutti gli isolati inclusi nell' analisi, chiamato anche outgroup

Valori di bootstrap: un'indicazione della frequenza con cui gli isolati connessi a quel nodo si sono raggruppati insieme durante le replicazioni di bootstrap

Valori di probabilità a posteriori: il valore calcolato per i nodi in una filogenesi bayesiana. Il valore è la probabilità di un albero dati i dati e viene interpretato come il supporto dei dati per una topologia specifica

Finanziato dall'Unione europea NextGenerationEU
Ministero dell'Università e della Ricerca
Italiadomani PIANO NAZIONALE DI RIPRESA E RESILIENZA
SUS-MIRRI.IT

Identificazione: saggi specie-specifici



Home > European Journal of Plant Pathology > Article

Development of novel species-specific primers for the specific identification of *Colletotrichum nymphaeae* based on conventional PCR and LAMP techniques

Published: 04 December 2019

Volume 156, pages 463–475, (2020) Cite this article

Ye *et al. BMC Bioinformatics* 2012, **13**:134
http://www.biomedcentral.com/1471-2105/13/134

BMC Bioinformatics

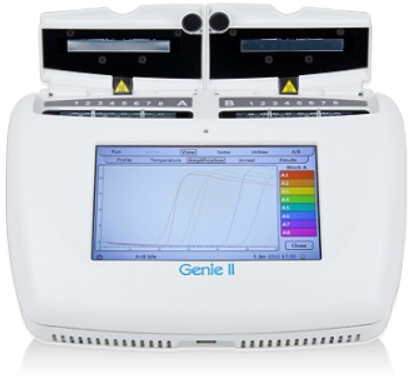
SOFTWARE Open Access

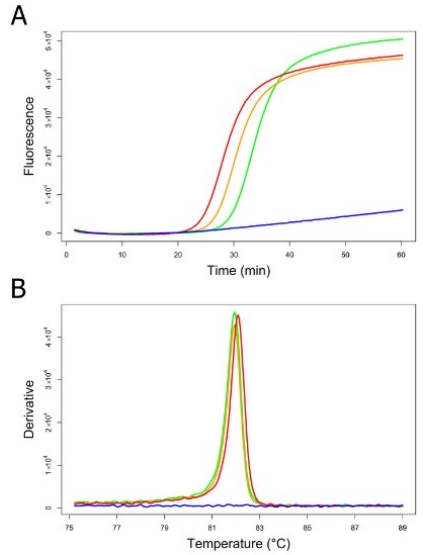
Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction

Jian Ye[1*], George Coulouris[1], Irena Zaretskaya[1], Ioana Cutcutache[2], Steve Rozen[2] and Thomas L Madden[1]

Primer3Plus

pick primers from a DNA sequence

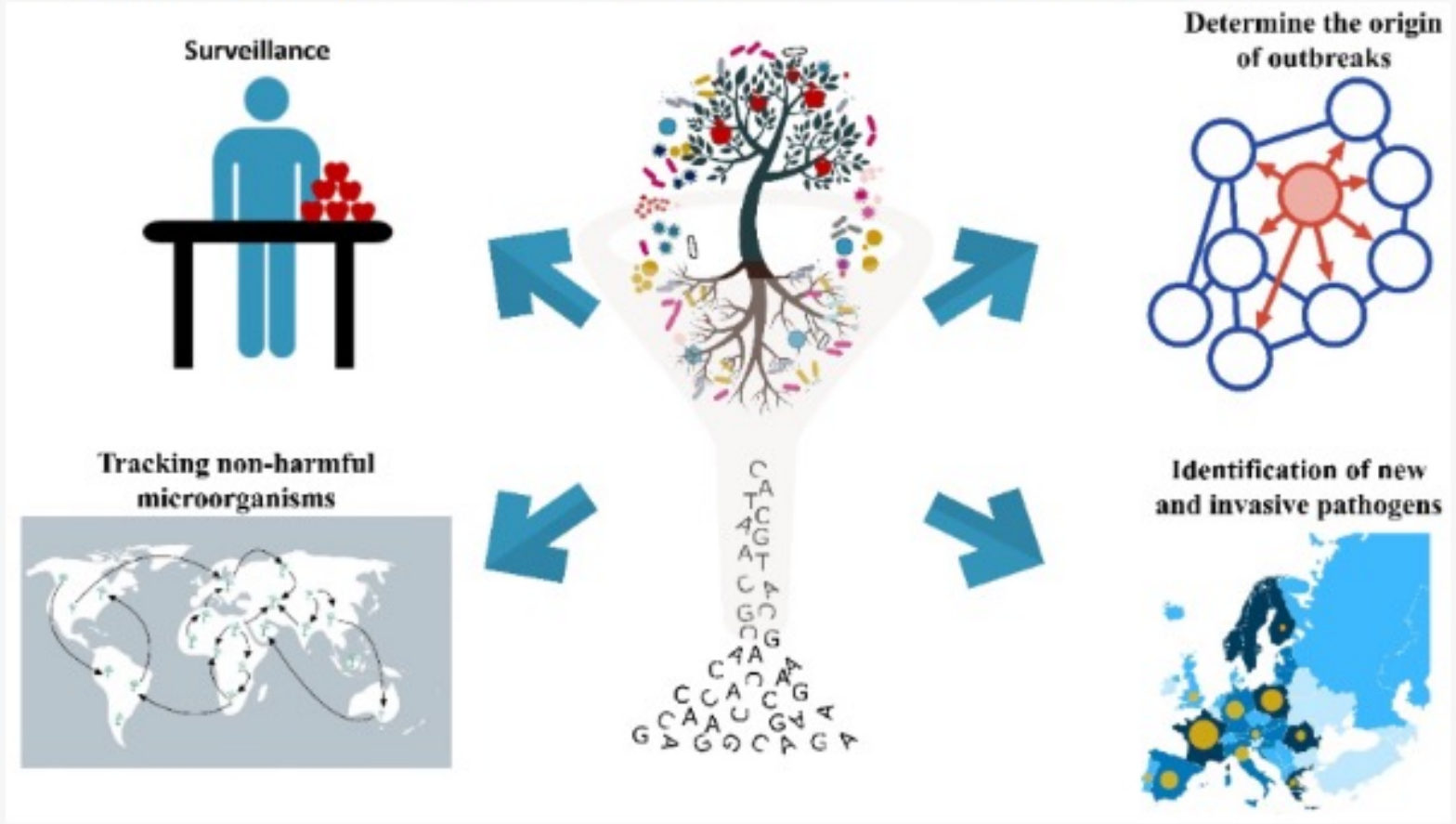




Finanziato dall'Unione europea NextGenerationEU
Ministero dell'Università e della Ricerca
Italiadomani PIANO NAZIONALE DI RIPRESA E RESILIENZA
SUS-MIRRI.IT

Identificazione: tecniche HTS - metabarcoding

Figure 1. Possible applications of shotgun and amplicon-based metagenomics.



https://doi.org/10.3390/microorganisms9010188

Finanziato dall'Unione europea NextGenerationEU
Ministero dell'Università e della Ricerca
Italiadomani PIANO NAZIONALE DI RIPRESA E RESILIENZA
SUS-MIRRI.IT

Ciclo di Training courses SUS-MIRRI.IT

Isolation and identification of plant pathogens based on biological and molecular techniques.

23 gennaio 2024

https://youtu.be/0jrWiV530QY?si=dmzSj7iKSTKXyM6V

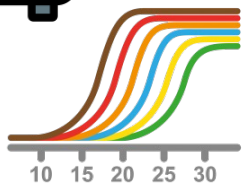
Finanziato dall'Unione europea NextGenerationEU
Ministero dell'Università e della Ricerca
Italiadomani PIANO NAZIONALE DI RIPRESA E RESILIENZA
SUS-MIRRI.IT

Ciclo di Training courses SUS-MIRRI.IT

Caso studio: *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* race 1: validazione di un saggio specifico per l'identificazione del patogeno da matrici differenti.

Finanziato dall'Unione europea NextGenerationEU
Ministero dell'Università e della Ricerca
Italiadomani PIANO NAZIONALE DI RIPRESA E RESILIENZA
SUS-MIRRI.IT

Real time PCR - qPCR



Strumento diagnostico molecolare per il rilevamento e la quantificazione rapidi, accurati e sensibili degli acidi nucleici

Monitoraggio in tempo reale della reazione di amplificazione

Tecnica basata sull'emissione di fluorescenza, la quale è direttamente correlata alla quantità di DNA amplificato

Può essere quantitativa. La quantità di DNA viene misurata dopo ogni ciclo

IN PATOLOGIA VEGETALE

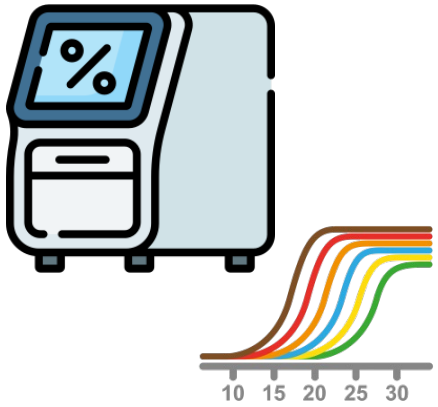
- Studio della diagnosi, dei livelli di inoculo, dell'epidemiologia e delle interazioni con i patogeni ospiti (in combinazione con la PCR a trascrizione inversa (RT-PCR) per quantificare i cambiamenti nell'espressione genica)

- Quantificare la quantità di agente patogeno presente in un campione per stimare i rischi potenziali rispetto allo sviluppo di malattie

Finanziato dall'Unione europea NextGenerationEU
Ministero dell'Università e della Ricerca
Italiadomani PIANO NAZIONALE DI RIPRESA E RESILIENZA
SUS-MIRRI.IT

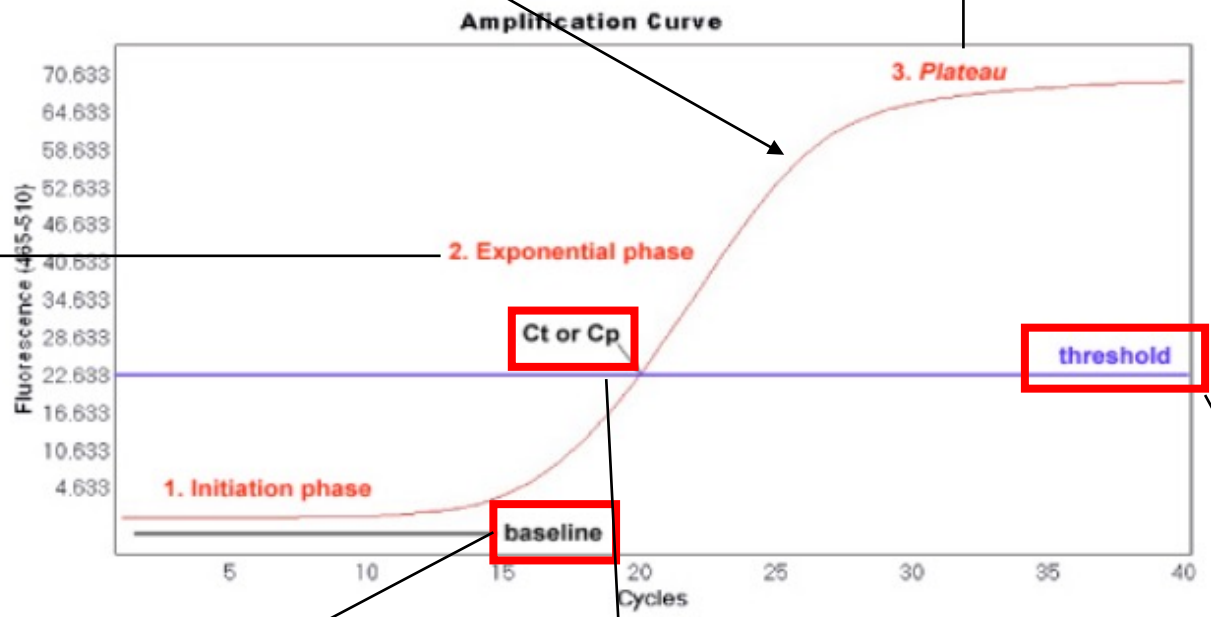
Real time PCR - qPCR

I reagenti sono consumati e la reazione è bloccata.



I reagenti sono parzialmente consumati e la reazione rallenta.

La quantità di DNA raddoppia ad ogni ciclo e il livello di fluorescenza cresce in modo proporzionale. Il numero di cicli necessari a rilevare la fluorescenza variano in funzione della quantità iniziale di DNA.



Primi cicli della reazione in cui non è ancora rilevabile la fluorescenza.

Primo ciclo in cui il livello di fluorescenza supera la threshold.

Interseca tutte le curve dei campioni nella loro fase di crescita esponenziale.

Finanziato dall'Unione europea NextGenerationEU
Ministero dell'Università e della Ricerca
Italiadomani PIANO NAZIONALE DI RIPRESA E RESILIENZA
SUS-MIRRI.IT

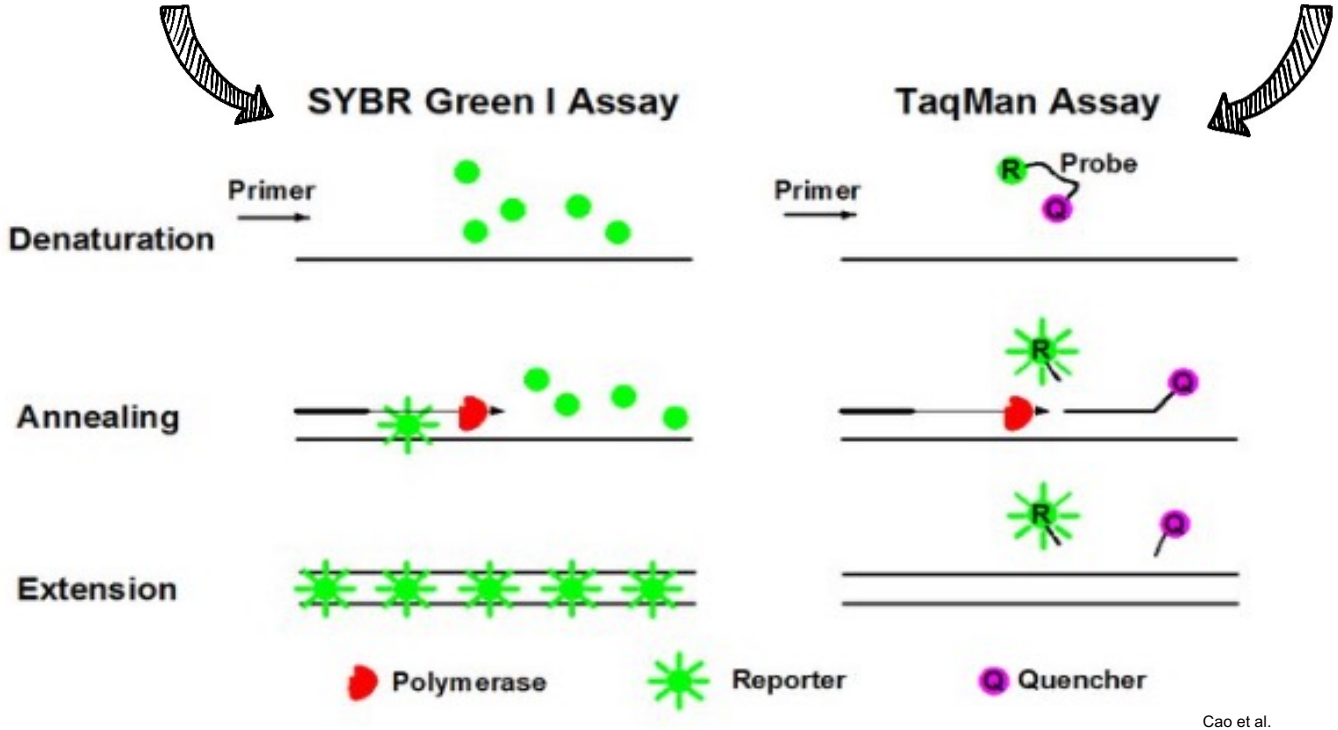
Chimiche fluorescenti

SYBR Green → molecola fluorescente che si intercala all'interno del doppio filamento di DNA.

Misurare la fluorescenza alla fine di ogni ciclo permette di determinare la quantità di DNA a doppia elica presente.

TaqMan→ nucleotide complementare alla sequenza bersaglio da amplificare che si ibrida all'interno del frammento amplificato.

Fluoroforo «REPORTER» che emette fluorescenza + «QUENCHER» che assorbe la fluorescenza.



Cao et al.

Finanziato dall'Unione europea NextGenerationEU
Ministero dell'Università e della Ricerca
Italiadomani PIANO NAZIONALE DI RIPRESA E RESILIENZA
SUS-MIRRI.IT

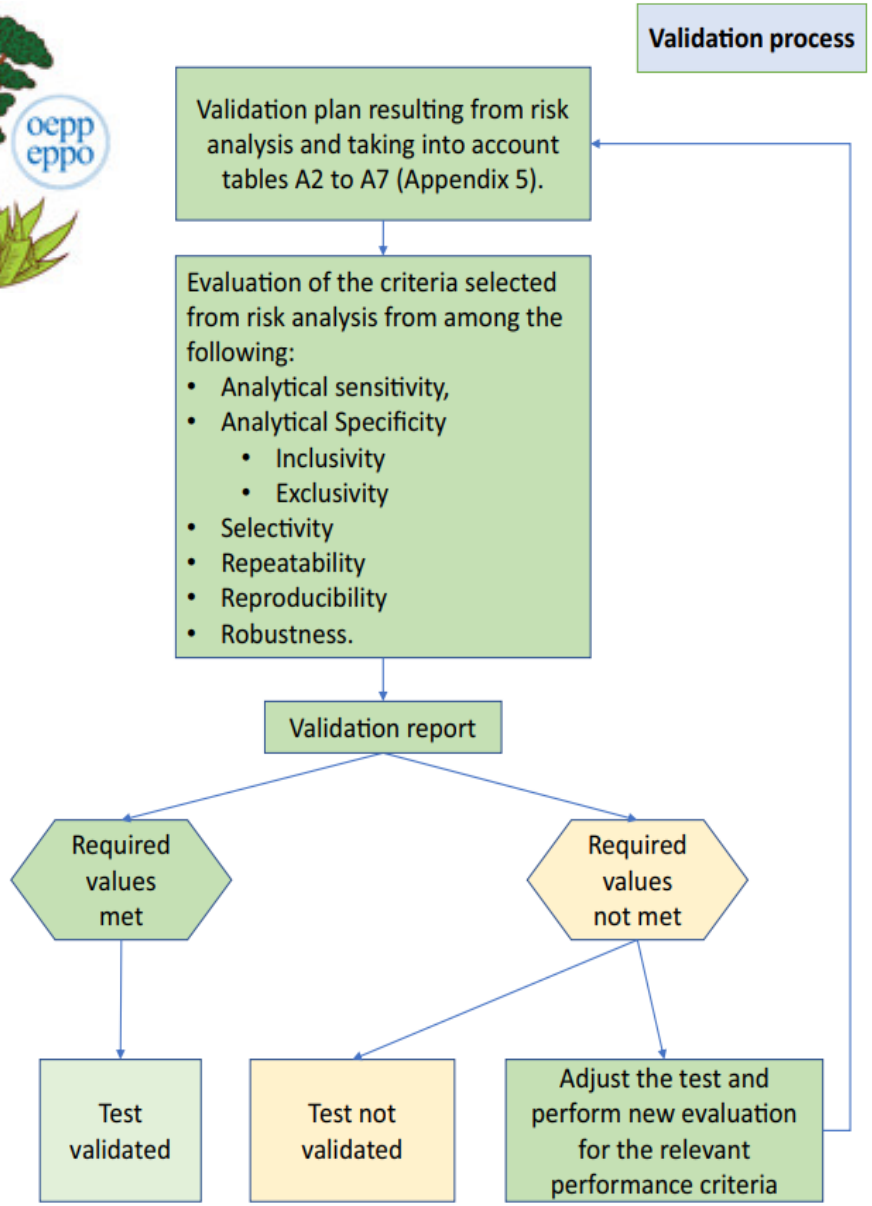
Validazione di un protocollo

PM 7/98 (5) - SPECIFIC REQUIREMENTS FOR LABORATORIES PREPARING ACCREDITATION

APPENDIX 5 - TABLES GIVING DETAILED GUIDANCE FOR THE VALIDATION PROCESS BY FIELD (BACTERIOLOGY, BOTANY, ENTOMOLOGY, MYCOLOGY, NEMATOLOGY, VIROLOGY AND PHYTOPLASMOLOGY)

Molecular methods, e.g. DNA barcoding, conventional PCR, real-time PCR, LAMP
This step also includes methods for isolation of nucleic acid from the matrix.

Analytical sensitivity	Perform at least three experiments with serial dilutions, preferably in host plant tissue extracts. Determine the minimum quantity of target (e.g. number of conidia, weight of infected material in healthy material) from which a detectable amount of target DNA can be obtained. If consistent results are not obtained after three experiments, additional experiments should be conducted
Analytical specificity	Inclusivity: analyse a range of strains of the target fungus/oomycete covering genetic diversity, different geographic origin and hosts. Exclusivity: analyse relevant non-target fungi (e.g. phylogenetically closely related fungi/oomycete), in particular those associated with the matrix. The concentration of nucleic acid should be high enough to maximize the possibility of cross reaction but remain realistic. *For inclusivity and exclusivity, the test results can be supported by 'in silico' comparison of probe/primer sequences to sequences in genomic libraries*
Selectivity	Not applicable for fungi if they have been previously isolated from the matrix and kept in pure culture. Determine whether variations in the matrix (e.g. different age/conditions/part of plant material or different cultivars of the host plant, types of soil) affect the test performance.
Repeatability	Analyse at least three replicates of sample extracts with a low concentration. determined by the results from the analytical sensitivity experiments. If consistent results are not obtained, additional replicates should be prepared and tested.
Reproducibility	As for repeatability, but with different operator(s) if possible, on different days and with different equipment when relevant.



Finanziato dall'Unione europea NextGenerationEU
Ministero dell'Università e della Ricerca
Italiadomani PIANO NAZIONALE DI RIPRESA E RESILIENZA
SUS-MIRRI.IT

Caso studio: *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* race 1: validazione di un saggio specifico per l'identificazione del patogeno da matrici differenti.

Fusarium oxysporum f. sp. *lactucae* (FOL) è un patogeno trasmesso dalle sementi e dal suolo responsabile dell'avvizzimento da *Fusarium* della lattuga (*Lactuca sativa* L.)

Osservato per la prima volta in Giappone nel 1955 (Motohashi, 1960) è stato successivamente riscontrato negli Stati Uniti d'America, in Asia, America Latina e in Europa ad inizio anni 2000.

Agente tracheofusariosi della lattuga

Patogeno appartenente al *Fusarium oxysporum species complex* (FOSC)
→ in Italia razza 1 e razza 4

Finanziato dall'Unione europea NextGenerationEU
Ministero dell'Università e della Ricerca
Italiadomani PIANO NAZIONALE DI RIPRESA E RESILIENZA
SUS-MIRRI.IT

Primer specifici per il rilevamento di *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* razza 1

TABLE 2. Name and 5′–3′ sequence of primers used in this study

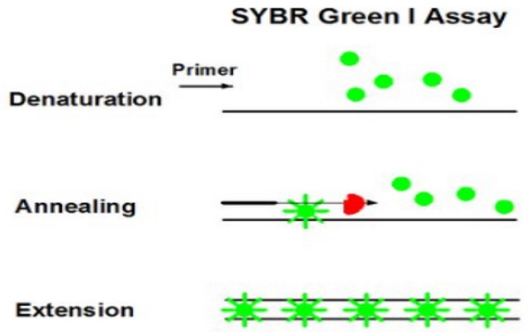
Primer name	Sequence
Gaga	5′-GGGAACCAACCGTCACA-3′
Gagi	5′-TAACCGCTAGGGTCGTAACA-3′
Hana	5′-CACGATTCACCTTAATATCTGACA-3′
Hani	5′-GAACCCTCCAACATTCAACA-3′
Hani3′	5′-CCCTCCAACATTCAACAACTG-3′
Hanilatt3rev	5′-ATTCACTGTACACCAACCTTTT-3′
FLA0101F[a]	5′-CTTATACCCCTGCTAGTTCC-3′
FLA0101R[a]	5′-ATCGAGAACCAATCCAGCTG-3′

[a] Primers from Shimazu et al. (58).

Pasquali et al. (2007)
Primer specifici disegnati seguendo lo schema per la tecnica **IR-SCAR**. Il primo primer è stato disegnato includendo nella sua sequenza una sequenza LTR (long terminal repeat), mentre il secondo primer è stato disegnato a partire dalla regione adiacente a quella impiegata per il disegno del primo primer.

Sviluppo di un saggio qPCR

Identificazione e quantificazione del patogeno a partire da diverse matrici in modo rapido, sensibile e specifico



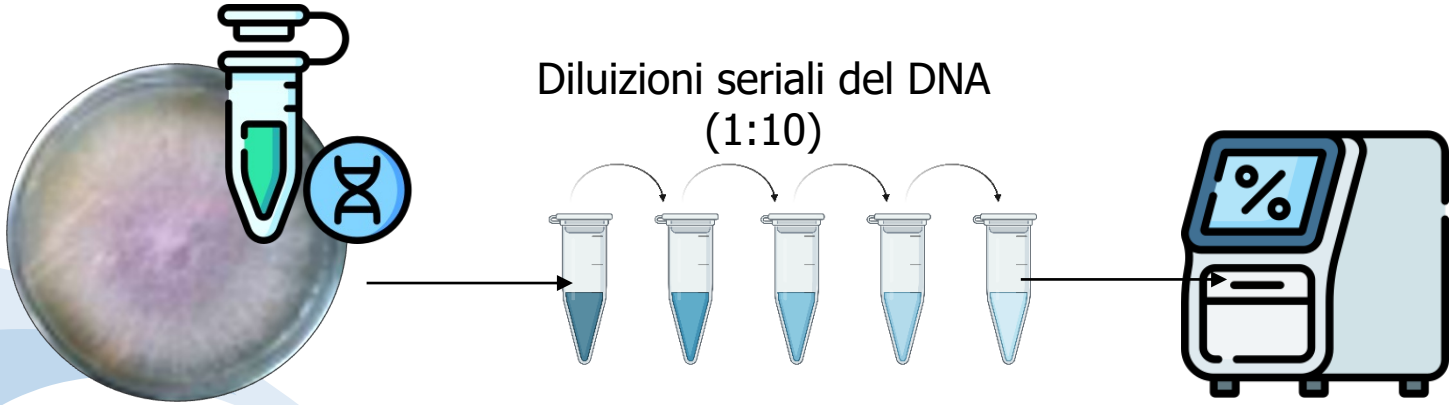
VALIDAZIONE

Finanziato dall'Unione europea NextGenerationEU
Ministero dell'Università e della Ricerca
Italiadomani PIANO NAZIONALE DI RIPRESA E RESILIENZA
SUS-MIRRI.IT

Validazione del saggio qPCR → PM 7/98 (5)

1. SENSIBILITÀ ANALITICA

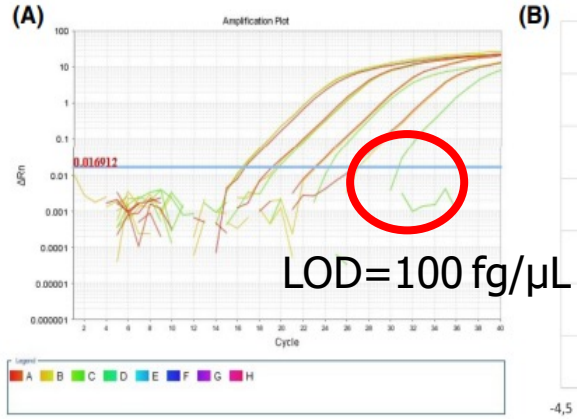
Eseguire almeno tre esperimenti con diluizioni seriali. Determinare la quantità minima di bersaglio (ad esempio numero di conidi, peso del materiale infetto in materiale sano) da cui è possibile ottenere una quantità rilevabile di DNA bersaglio.



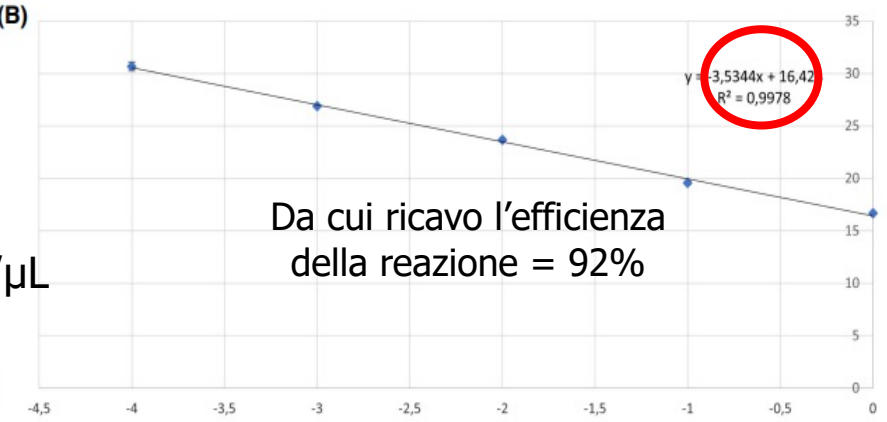
Diluizioni seriali del DNA (1:10)

Estrazione DNA da colonia patogeno bersaglio

Saggio qPCR in triplicato → ottengo retta di taratura



LOD=100 fg/µL



Da cui ricavo l'efficienza della reazione = 92%

Finanziato dall'Unione europea NextGenerationEU
Ministero dell'Università e della Ricerca
Italiadomani PIANO NAZIONALE DI RIPRESA E RESILIENZA
SUS-MIRRI.IT

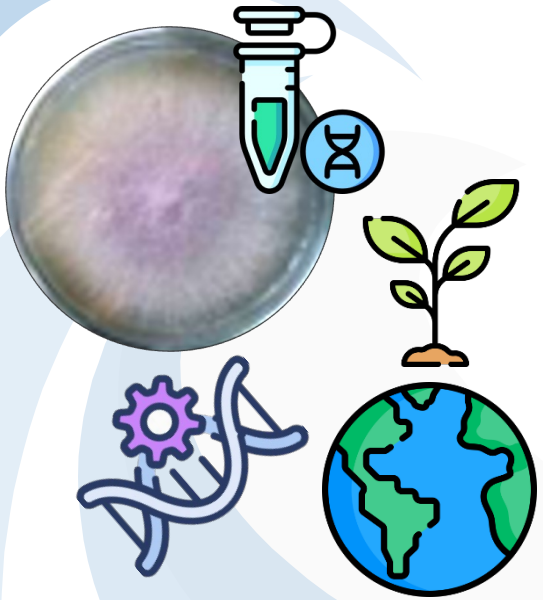
Validazione del saggio qPCR → PM 7/98 (5)

2. SPECIFICITÀ ANALITICA

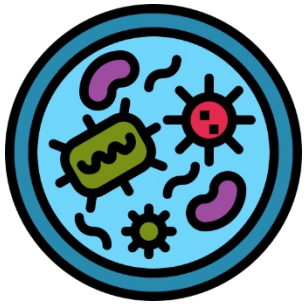
Inclusività: analizzare una gamma di ceppi del fungo/oomicete bersaglio che coprono diversità genetica, origine geografica e ospiti diversi.

Esclusività: analizzare i microorganismi non bersaglio (ad esempio funghi/oomiceti filogeneticamente correlati), in particolare quelli associati alla matrice.

Inclusività



Esclusività



Ceppi di *Fusarium* spp. + patogeni della lattuga

TABLE 2 Strains used in this study to check the specificity of the real-time PCR assay for FOL race 1 (Ct, melting °C). Standard deviation was included for each Ct and melting temperature. Neg = negative, melting = melting temperature

				Real-time PCR	
Species	Origin	Year of isolation	Isolate code	Ct	Melting (°C)
F. oxysporum f.sp. *lactucae* race 1	Italy	2007	Mya 3040	16.00±0.34	74.04 ±0.00
F. oxysporum f.sp. *lactucae* race 1	Italy	2018	FL 7/18	16.37±1.27	73.94 ±0.09
F. oxysporum f.sp. *lactucae* race 1	Italy	2016	FL 8/16	16.30±0.13	73.99 ±0.08
F. oxysporum f.sp. *lactucae* race 1	USA	2006	SB1-1 MAFF 244120	17.46±0.41	73.88 ±0.07
F. oxysporum f.sp. *lactucae* race 1	Japan	2005	JCP 043	16.37±0.15	73.78 ±0.00
F. oxysporum f.sp. *lactucae* race 1	USA	2002	AZ - 2002-01	18.11±0.26	74.19 ±0.00
F. oxysporum f.sp. *lactucae* race 1	France	2016	FOL 8/16	18.60±0.82	74.33 ±0.21
F. oxysporum f.sp. *lactucae* race 4	Italy	2019	FL 8/19	Neg	61.35 ±0.00
F. proliferatum	Italy	2020	P 9.6	Neg	61.34 ±0.00
F. fujikuroi	Italy	2006	I1.3	Neg	61.35 ±0.21
F. verticillioides	Italy	2020	P12.3	Neg	61.30 ±0.08
F. avenaceum	Italy	2020	AMBR 3-1	Neg	63.29 ±3.36
F. oxysporum f. sp. *conglutinans*	Italy	2019	CVG1	Neg	61.39 ±0.38
F. oxysporum f. sp. *cucumerinum*	Italy	2019	CVG3	Neg	61.25 ±0.09
F. oxysporum	Italy	2019	CVG116	Neg	61.35 ±0.00
F. oxysporum f. sp. *spinaciae*	Italy	2019	CVG346	Neg	
F. oxysporum f. sp. *radicis-capsici*	Italy	2020	P17.D	Neg	
Alternaria alternata	Italy	2017	19–53	Neg	
Rhizoctonia solani	Italy	2018	RH	Neg	
Verticillium dahlie	Italy	2013	19–48	Neg	

Finanziato dall'Unione europea NextGenerationEU
Ministero dell'Università e della Ricerca
Italiadomani PIANO NAZIONALE DI RIPRESA E RESILIENZA
SUS-MIRRI.IT

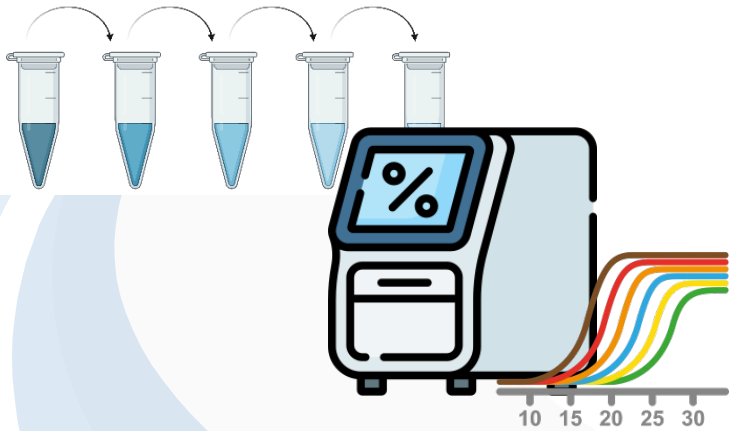
Validazione del saggio qPCR → PM 7/98 (5)

3. SELETTIVITÀ

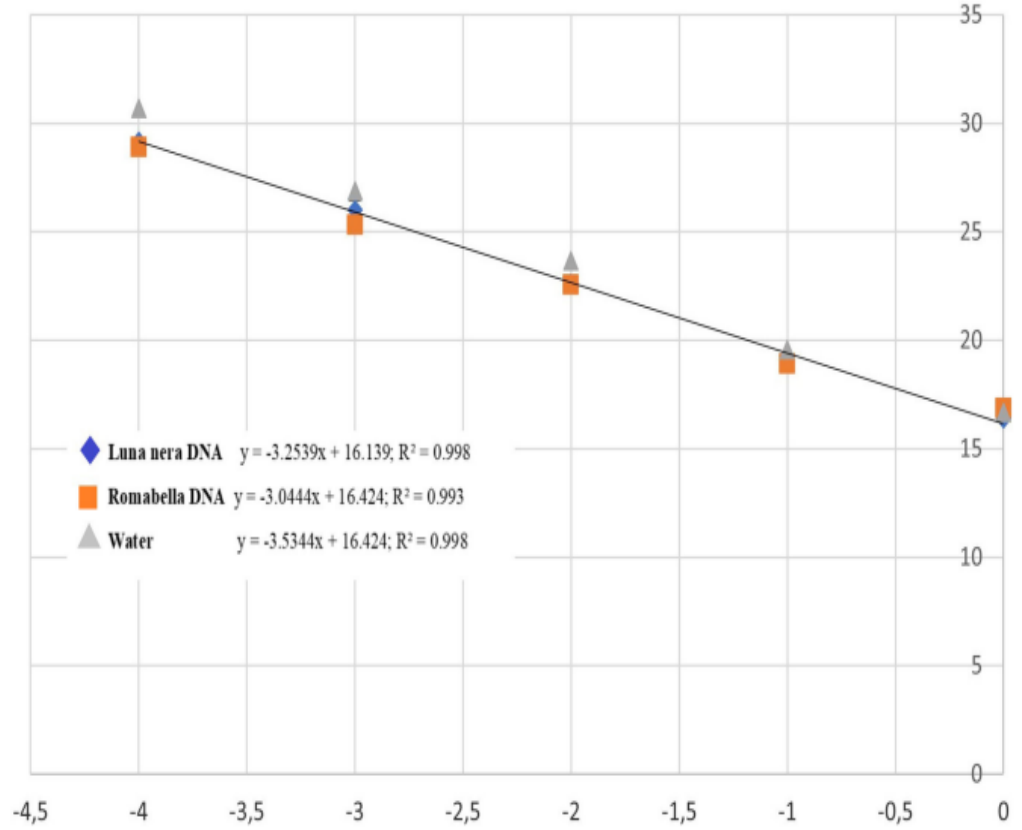
Determinare se le variazioni nella matrice (ad esempio età/condizioni/parte diversa del materiale vegetale o diverse cultivar della pianta ospite, tipi di terreno) influiscono sulle prestazioni del test.

Rette di taratura allestite con diluizioni seriali (1:10) del DNA di FOL diluito in:

1. Acqua
2. DNA estratto da ipocotile di lattuga cv Luna nera (suscettibile)
3. DNA estratto da ipocotile di lattuga cv Romabella (resistente)



Non è stata osservata alcuna influenza sulla selettività del saggio.



Finanziato dall'Unione europea NextGenerationEU
Ministero dell'Università e della Ricerca
Italiadomani PIANO NAZIONALE DI RIPRESA E RESILIENZA
SUS-MIRRI.IT

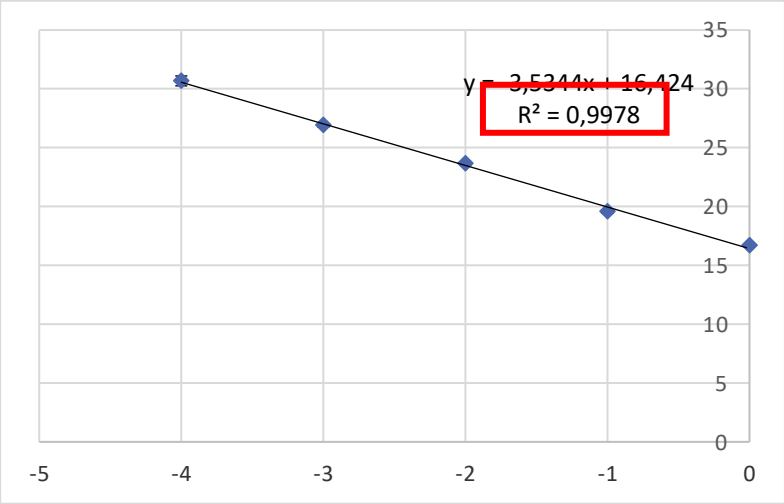
Validazione del saggio qPCR → PM 7/98 (5)

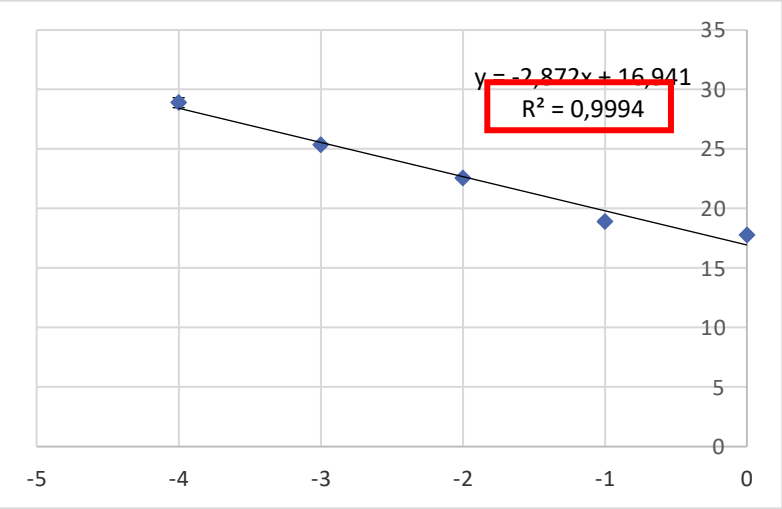
4. RIPETIBILITÀ

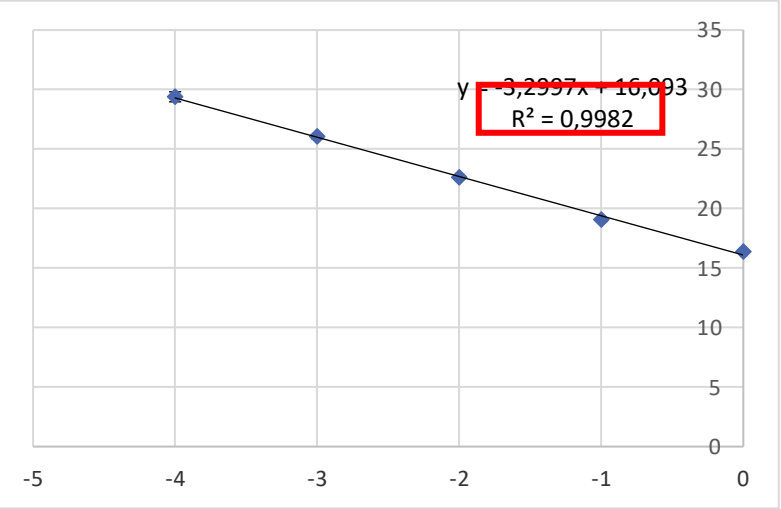
Analizzare almeno tre repliche di estratti di campioni con una concentrazione bassa. Determinata dai risultati degli esperimenti di sensibilità analitica. Se non si ottengono risultati coerenti, è necessario preparare e testare ulteriori repliche.

5. RIPRODUCIBILITÀ

Come per la ripetibilità, ma con operatori diversi se possibile, in giorni diversi e con attrezzature diverse quando pertinente.





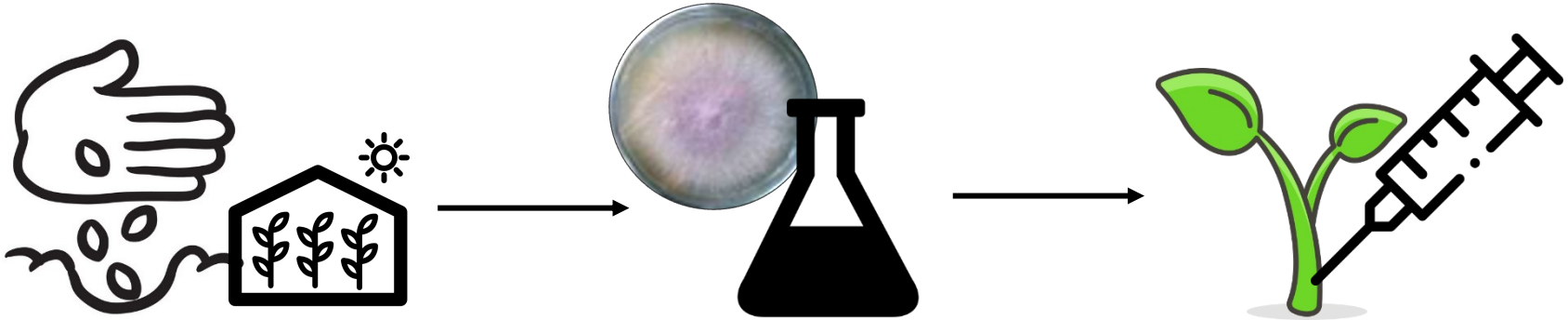


Ripetibilità e riproducibilità sono state confermate producendo amplificazioni affidabili al 100% tra le repliche, sia biologiche che tecniche, quando testate in condizioni di analisi invariate o con operatori diversi.

Finanziato dall'Unione europea NextGenerationEU
Ministero dell'Università e della Ricerca
Italiadomani PIANO NAZIONALE DI RIPRESA E RESILIENZA
SUS-MIRRI.IT

Applicazione del metodo validato su campioni reali artificialmente inoculati

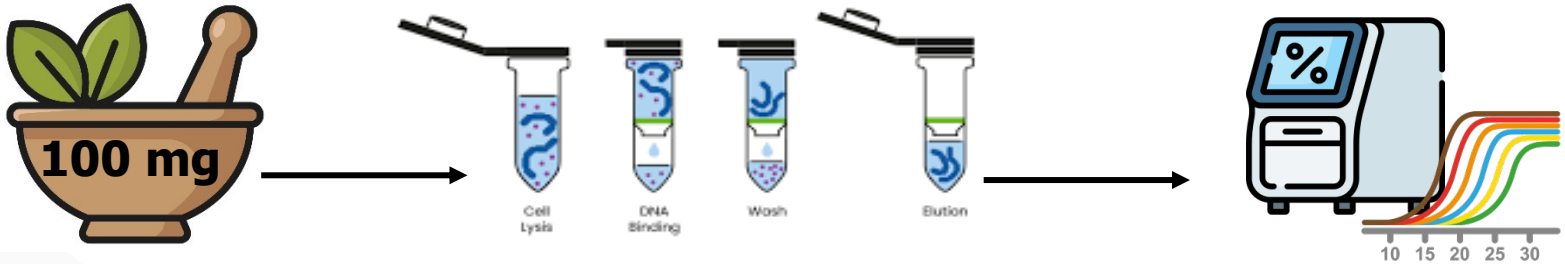
Cinque cultivar di lattuga con diversi gradi di suscettibilità a *F. oxysporum* f. sp. *lactucae* razza 1 sono state coltivate in serra e artificialmente inoculate con una sospensione conidica ($1*10^6$ conidi/ml) del patogeno dopo 15 giorni dalla semina.



Un totale di 54 piantine per cultivar, sono state campionate a 7 e 14 giorni dall'inoculazione e macinati con azoto liquido con mortaio e pestello per ottenere una polvere.

Estrazione DNA con kit commerciale

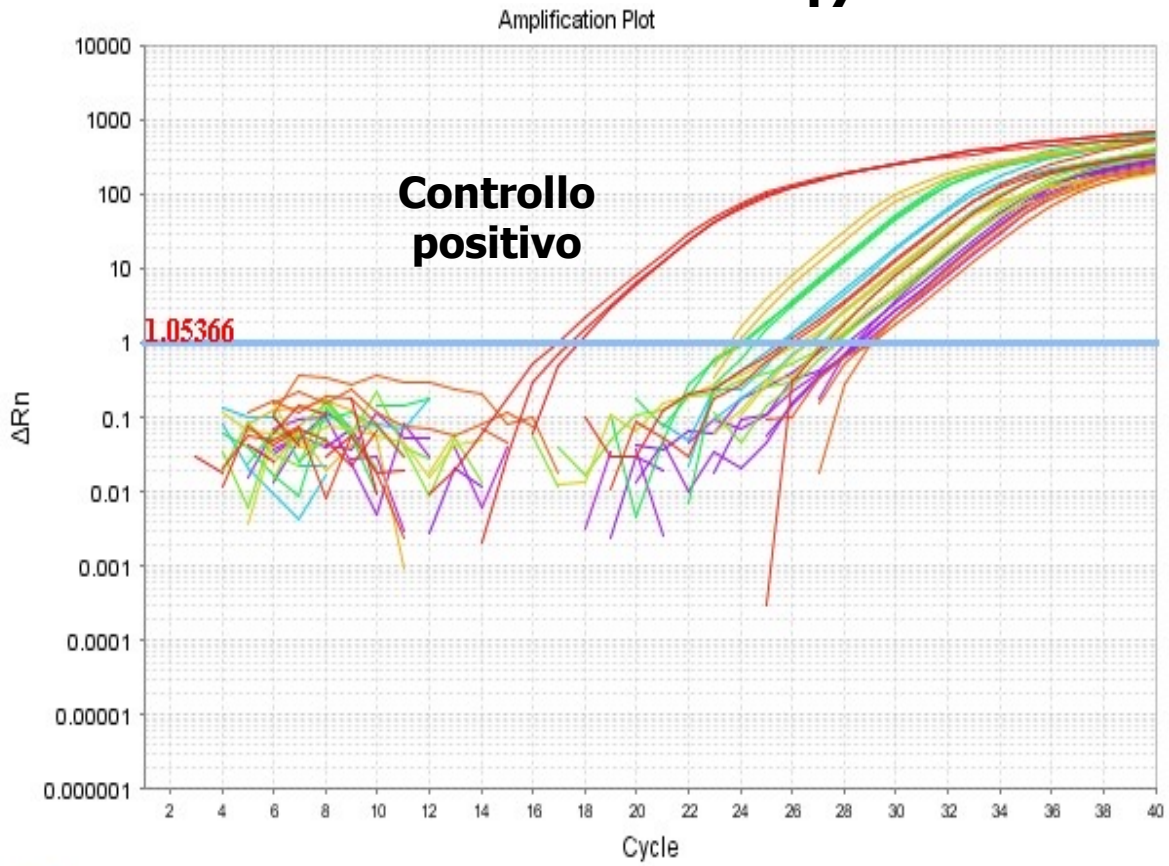
Sono stati eseguiti test qPCR includendo tre repliche tecniche di ciascun campione di DNA, incluso un controllo positivo (DNA FL 7–18) e uno negativo.



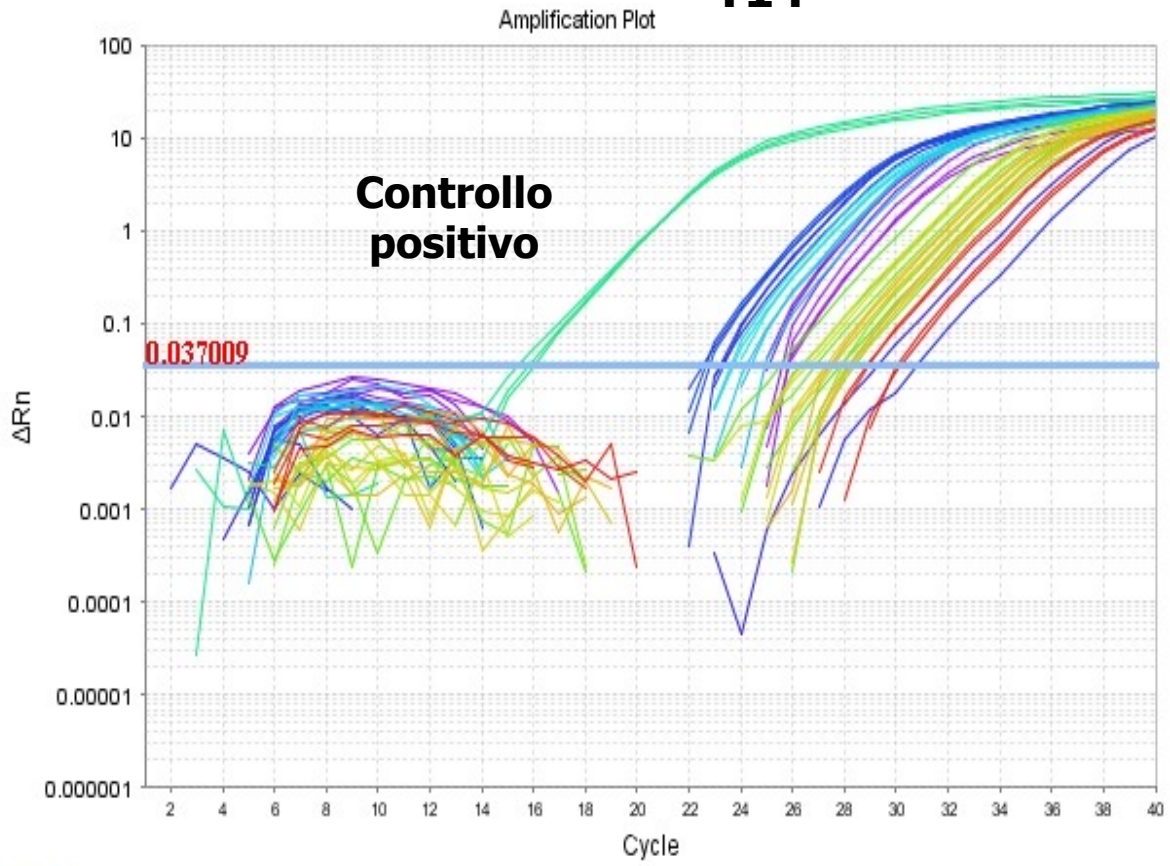
Finanziato dall'Unione europea NextGenerationEU
Ministero dell'Università e della Ricerca
Italiadomani PIANO NAZIONALE DI RIPRESA E RESILIENZA
SUS-MIRRI.IT

Applicazione del metodo validato su campioni reali artificialmente inoculati

T7



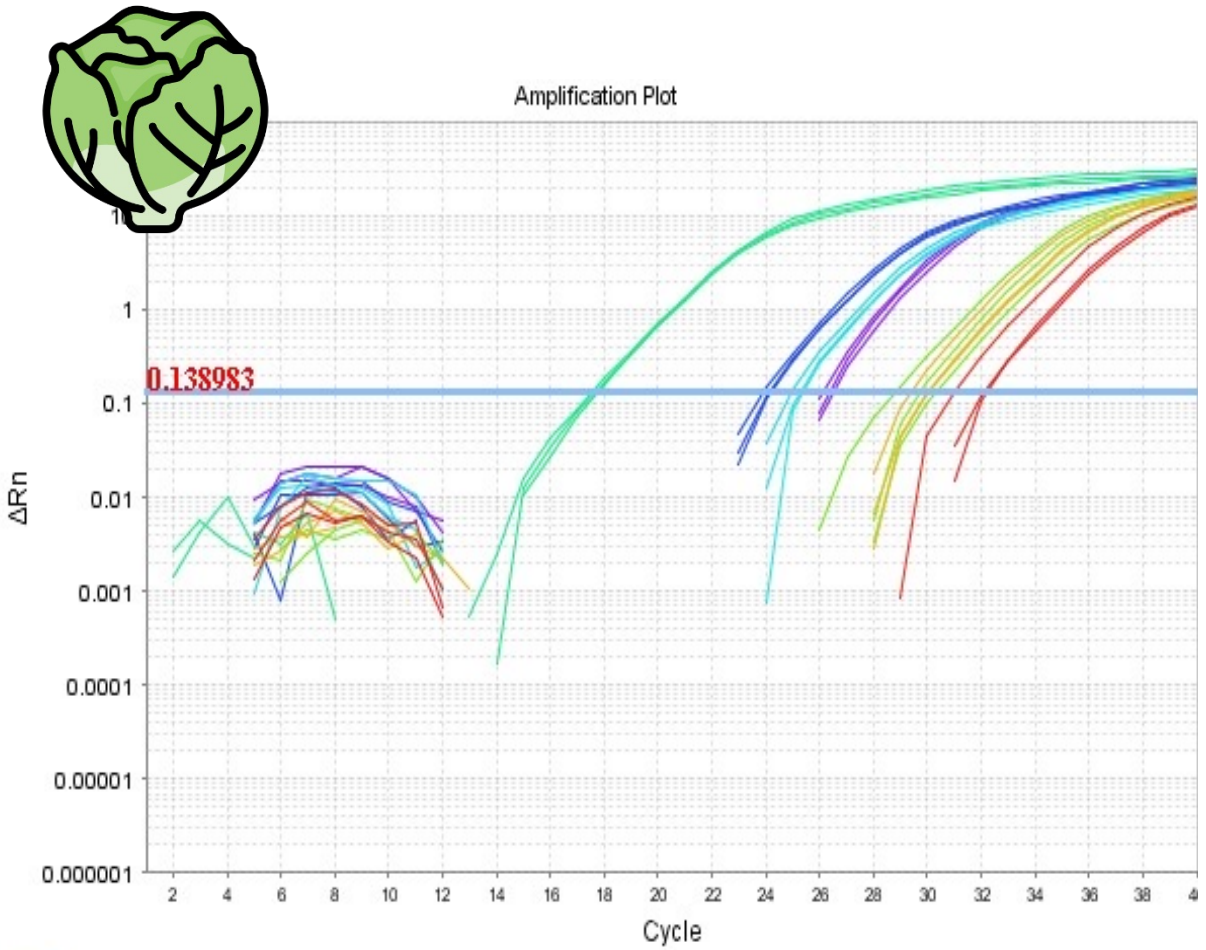
T14

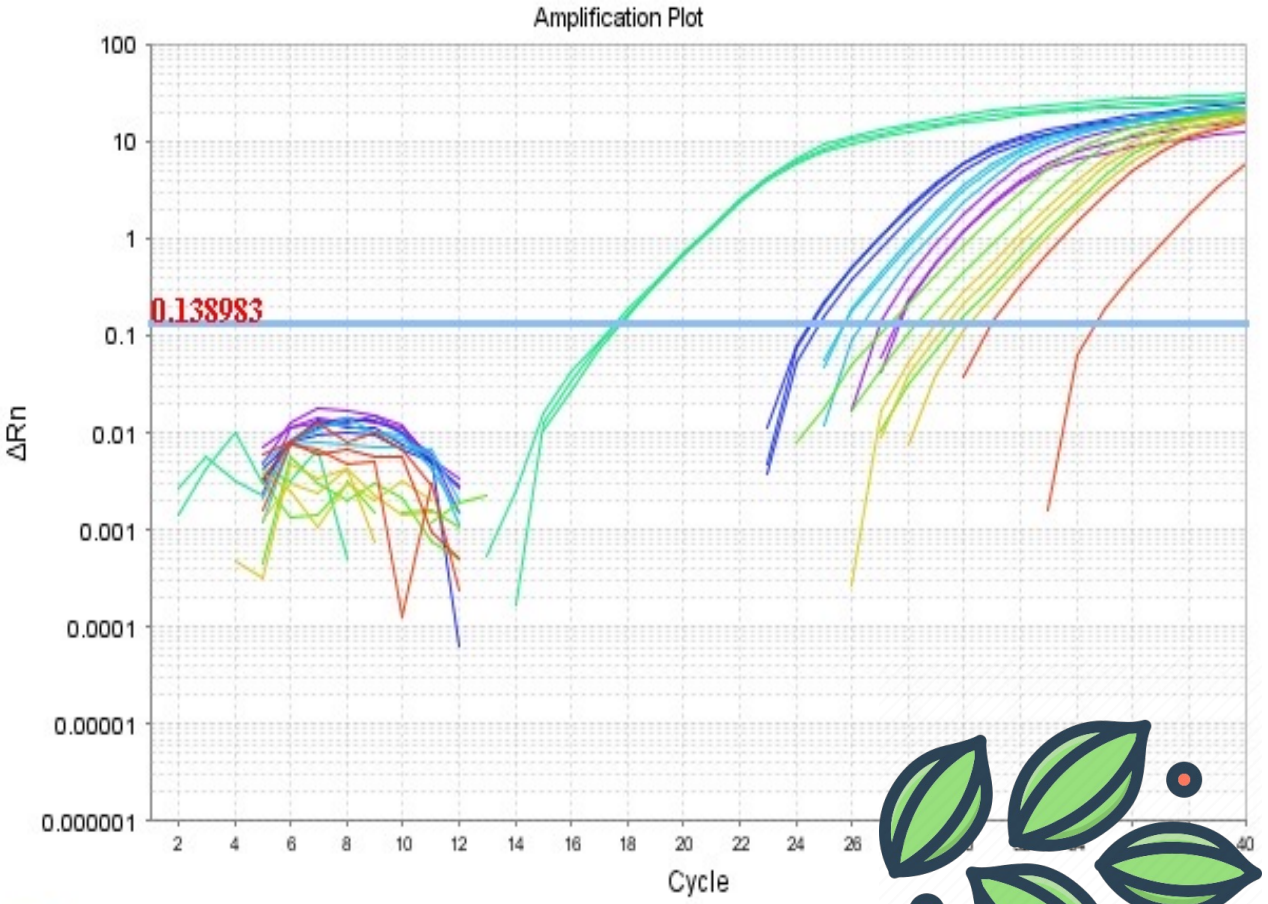


Il saggio è in grado di rilevare la presenza del patogeno nei tessuti dell'ospite artificialmente inoculato sia a 7 che a 14 giorni dall'inoculazione.

Finanziato dall'Unione europea NextGenerationEU
Ministero dell'Università e della Ricerca
Italiadomani PIANO NAZIONALE DI RIPRESA E RESILIENZA
SUS-MIRRI.IT

Applicazione del metodo validato su campioni reali naturalmente infetti





Finanziato dall'Unione europea NextGenerationEU
Ministero dell'Università e della Ricerca
Italiadomani PIANO NAZIONALE DI RIPRESA E RESILIENZA
SUS-MIRRI.IT

Ciclo di Training courses SUS-MIRRI.IT

Caso studio: Caratterizzazione degli agenti causali della patina bianca della mela

Finanziato dall'Unione europea NextGenerationEU
Ministero dell'Università e della Ricerca
Italiadomani PIANO NAZIONALE DI RIPRESA E RESILIENZA
SUS-MIRRI.IT

Produzione della mela in Italia

56.957 ha coltivati

> 2 milioni di tonnellate nel 2021

Emilia Romagna, Piemonte, Lombardia, Trentino e Alto Adige

Venturia inaequalis

Venturia asperata

Turan et al. 2019, EJPP

***Neofabraea* spp.**
Bull's eye rot

Gli agenti patogeni latenti avviano infezioni durante diverse fasi fenologiche nel frutteto.

Colletotrichum fioriniae: 'Gala', 'Story Inored', 'Opal'
Colletotrichum godetiae 'Red Delicious'
Colletotrichum acutatum 'Story Inored'

Monilinia polystroma

Rosati et al. 2021, Plant Disease

***Alternaria* spp.**

Macchie nere e marciumi della mela e della pera

Oettl et al. 2021 JAFC
Prencipe et al., 2023 Phytopathology

UNIVERSITÀ DI TORINO
DISAFA Università degli studi di Torino
Finanziato dall'Unione europea NextGenerationEU
Ministero dell'Università e della Ricerca
Italiadomani PIANO NAZIONALE DI RIPRESA E RESILIENZA
SUS-MIRRI.IT

New apple varieties

'Story Inored'

'Crimson Crisp'

'Opal'

'Fujion'

'Smeralda'

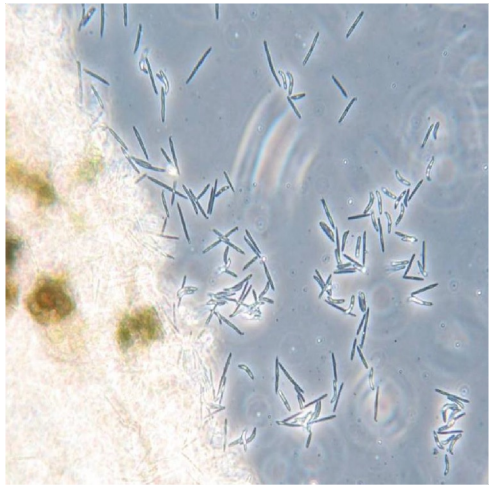
'Ambrosia'

Con l'introduzione di nuove varietà di mele, emergono diverse malattie quali:
-il marciume lenticellare, causato da *Ramularia mali*,
-patina bianca causata da Entylomatales e Golubeviales.

UNIVERSITÀ DI TORINO
DISAFA Università degli studi di Torino
Finanziato dall'Unione europea NextGenerationEU
Ministero dell'Università e della Ricerca
Italiadomani PIANO NAZIONALE DI RIPRESA E RESILIENZA
SUS-MIRRI.IT

Un’alterazione della buccia delle mele: una seria minaccia per la produzione

Alterazione: difetti estetici
Pellicola superficiale cerosa e biancastra/grigia sulla cuticola



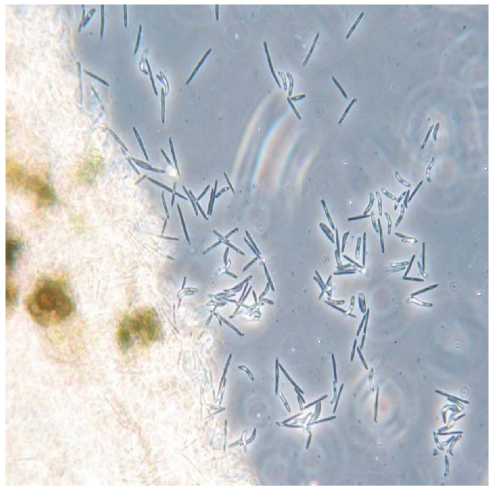
yeast-like basidiomiceti, sprofiti.
Ordine: **Entylomatales e Golubeviales**
(*G. pallescens* and *T. washingtonensis*)

Riportati in Italia, Paesi Bassi (1999), Germania e Croazia

UNIVERSITÀ DI TORINO
DISAFA Università degli studi di Torino
Finanziato dall'Unione europea NextGenerationEU
Ministero dell’Università e della Ricerca
Italiadomani PIANO NAZIONALE DI RIPRESA E RESILIENZA
SUS-MIRRI.IT

Un’alterazione della buccia delle mele: una seria minaccia per la produzione

Pre-raccolta
Alla raccolta
Post-raccolta



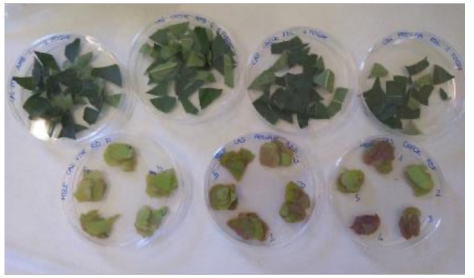
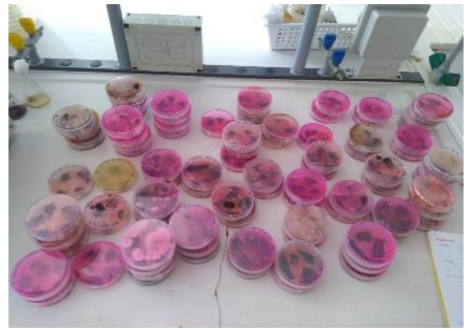
FATTORI PREDISPONENTI

- Elevata umidità durante la stagione
- Piogge durante maggio-giugno e alla raccolta
- Basse temperature
- Elevata densità di impianto
- Frutteti in pianura
- Reti antigrandine
- Suoli ricchi di sostanza organica

UNIVERSITÀ DI TORINO
DISAFA Università degli studi di Torino
Finanziato dall'Unione europea NextGenerationEU
Ministero dell’Università e della Ricerca
Italiadomani PIANO NAZIONALE DI RIPRESA E RESILIENZA
SUS-MIRRI.IT

Patina bianca: monitoraggio e isolamento

Monitoraggio mensile da maggio a settembre in frutteti nelle zone del Piemonte, Trentino e Alto Adige

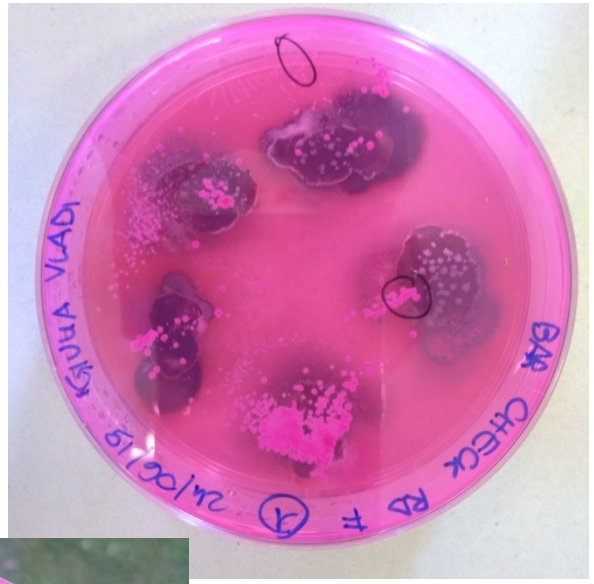



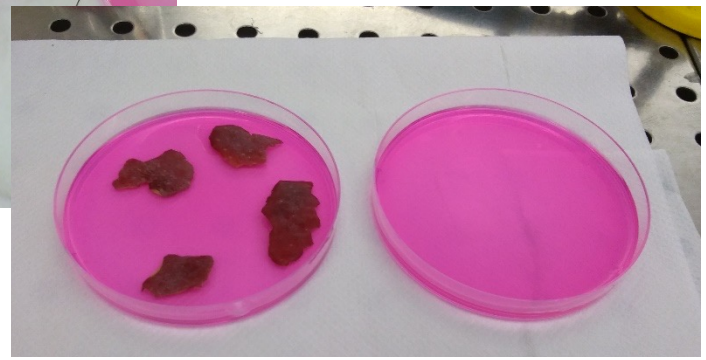
CORTECCIA **FOGLIE** **FRUTTI**

2019 e 2020

Rose Bengal Chloramphenicol agar (RBCA) e metodo della «caduta delle spore»

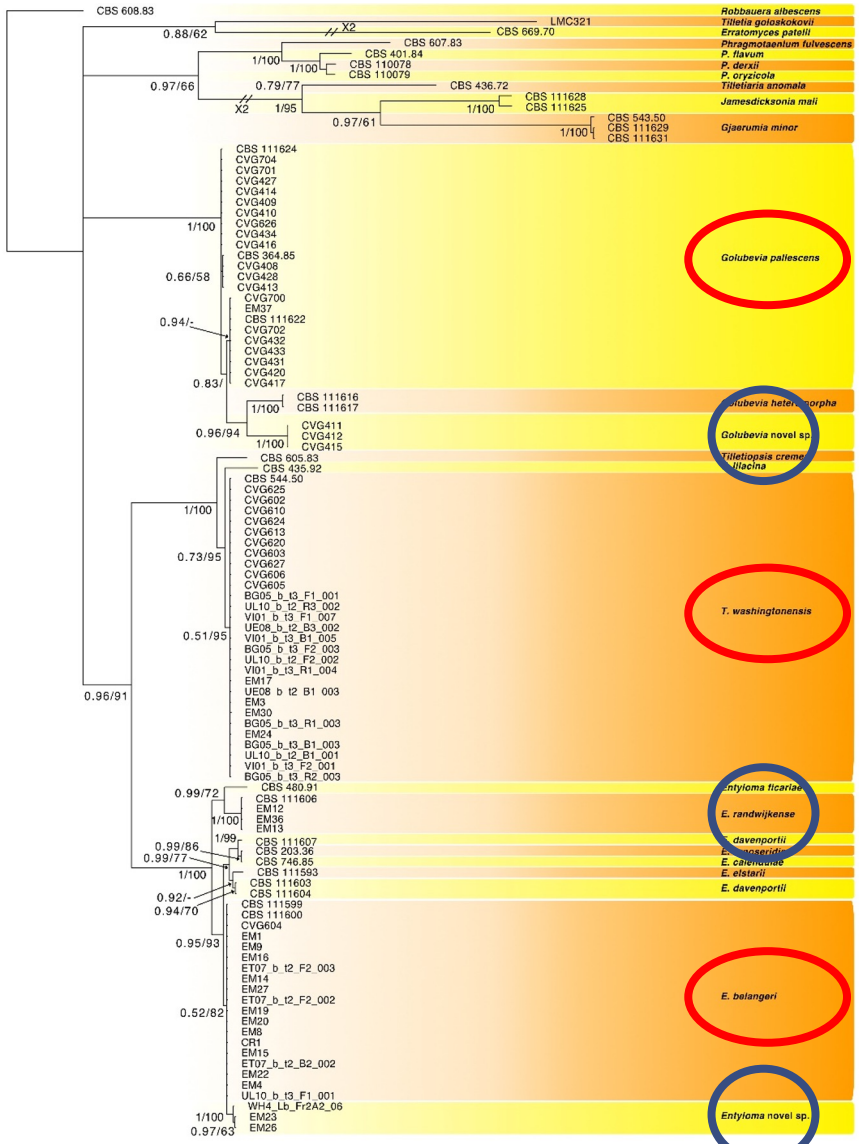
UNIVERSITÀ DI TORINO
DISAFA Università degli studi di Torino
Finanziato dall'Unione europea NextGenerationEU
Ministero dell'Università e della Ricerca
Italiadomani PIANO NAZIONALE DI RIPRESA E RESILIENZA
SUS-MIRRI.IT



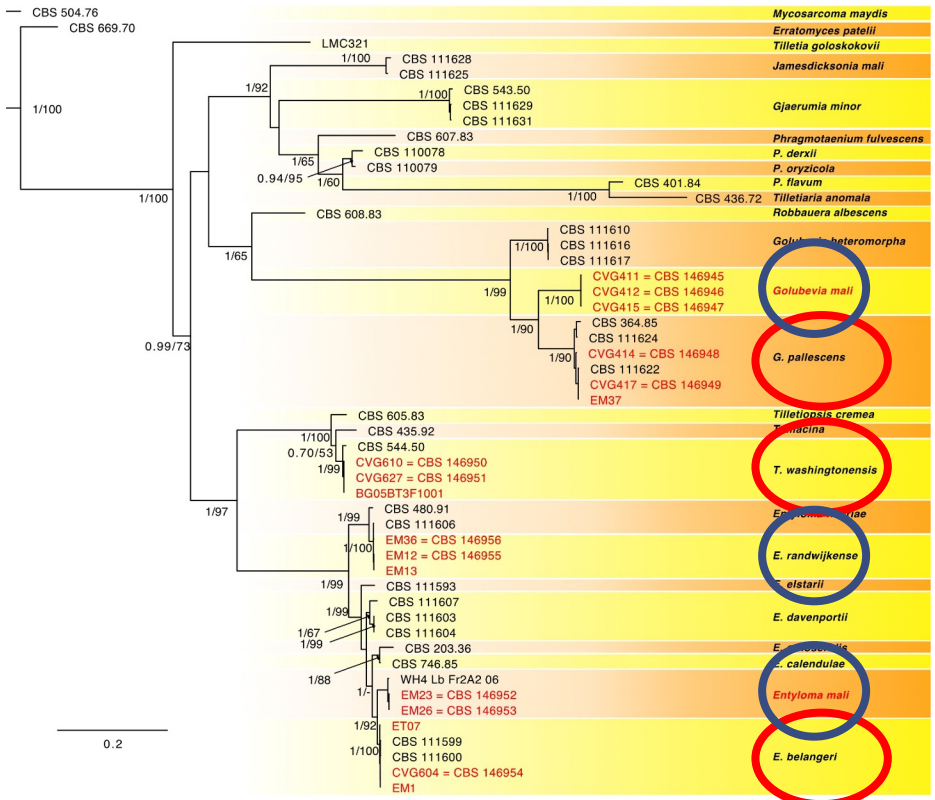


UNIVERSITÀ DI TORINO
DISAFA Università degli studi di Torino
Finanziato dall'Unione europea NextGenerationEU
Ministero dell'Università e della Ricerca
Italiadomani PIANO NAZIONALE DI RIPRESA E RESILIENZA
SUS-MIRRI.IT

Agenti della patina bianca: identificazione



Consensus phylogram basato su analisi ITS.



Consensus phylogram basato su analisi ITS, D1D2, *TEF1*, and *RPB2*.

6 specie appartenenti a 3 generi: *Tilletiopsis*, *Golubevia*, *Entyloma*

3 specie principali: *T. washingtonensis, G. pallescens, E. belangeri*

3 specie meno frequenti : *E. randwijkense, Golubevia nov. sp., Entyloma nov. sp.*

UNIVERSITÀ DI TORINO
DISAFA Università degli studi di Torino
Finanziato dall'Unione europea NextGenerationEU
Ministero dell'Università e della Ricerca
Italiadomani PIANO NAZIONALE DI RIPRESA E RESILIENZA
SUS-MIRRI.IT

Agenti della patina bianca: identificazione

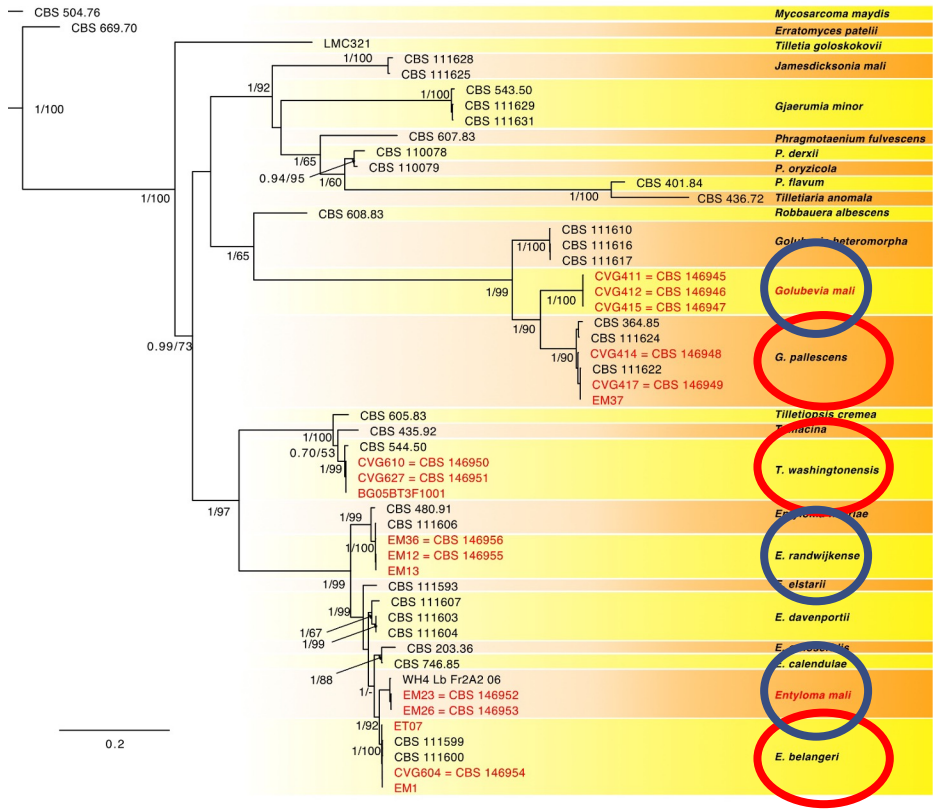
Monitoraggio 2019
Specie più frequente: ***Golubevia pallescens***

Monitoraggio 2020
Specie più frequente : ***T. washingtoniensis***

Monitoraggio 2019 per area geografica

	Piemonte	Trentino	Alto Adige
T. washingtonensis	10	4	14
E. belangeri	1	11	4
G. pallescens	19	1	0

Guarnaccia et al. 2024



Consensus phylogram basato su analisi ITS, D1D2, *TEF1*, and *RPB2*.

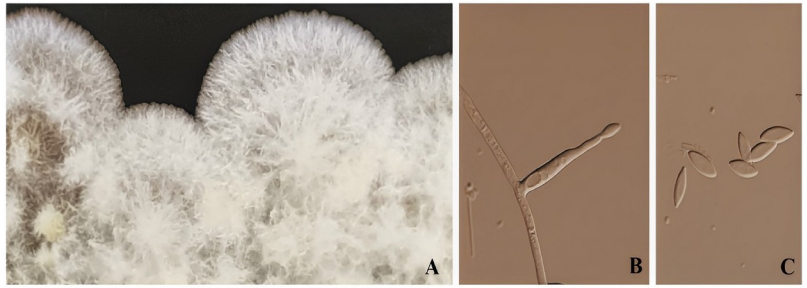
6 specie appartenenti a 3 generi: *Tilletiopsis*, *Golubevia*, *Entyloma*

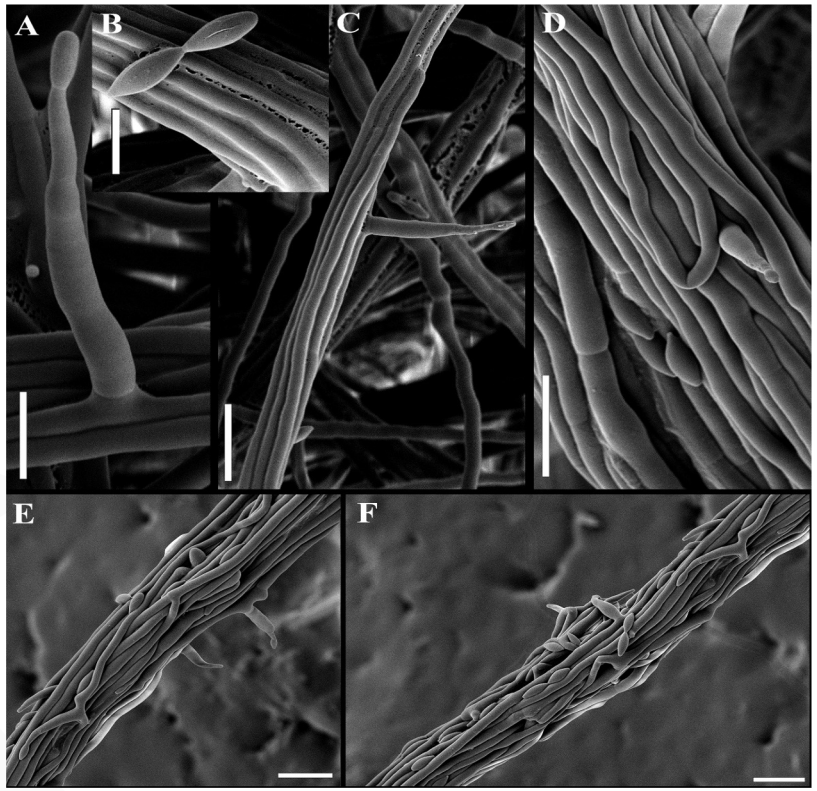
3 specie principali: *T. washingtonensis, G. pallescens, E. belangeri*

3 specie meno frequenti : *E. randwijkense, Golubevia nov. sp., Entyloma nov. sp.*

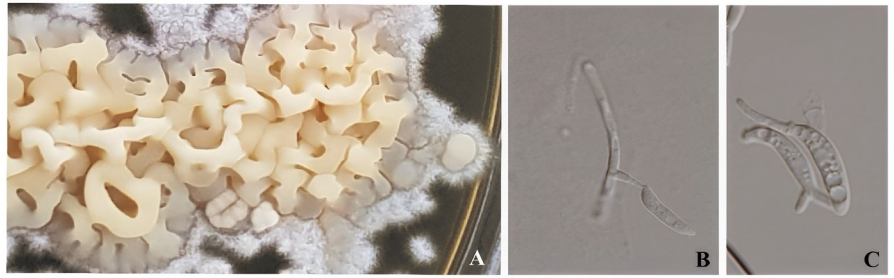
UNIVERSITÀ DI TORINO
DISAFA Università degli studi di Torino
Finanziato dall'Unione europea NextGenerationEU
Ministero dell'Università e della Ricerca
Italiadomani PIANO NAZIONALE DI RIPRESA E RESILIENZA
SUS-MIRRI.IT

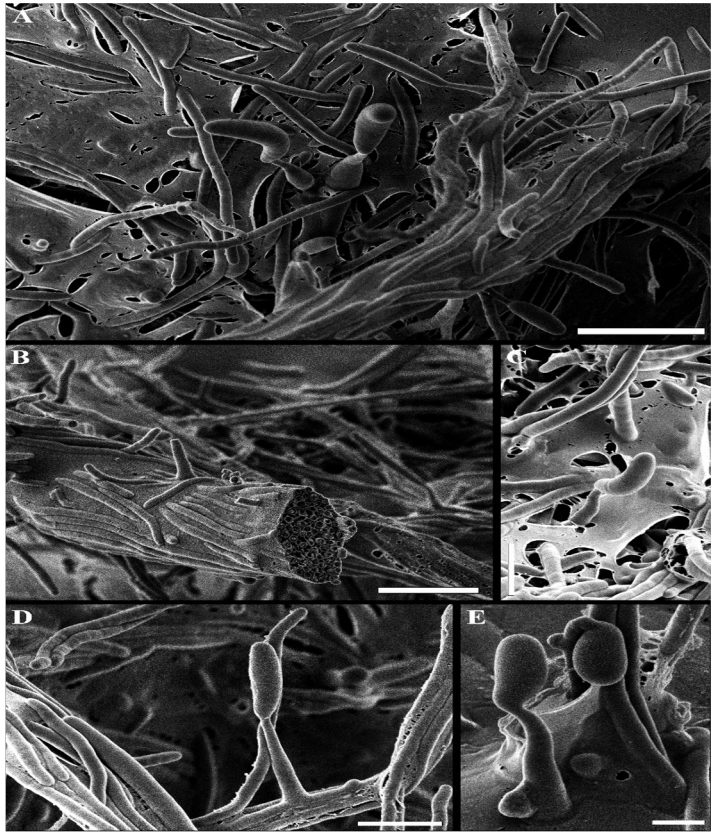
Entyloma mali nov. sp.





Golubevia mali nov. sp.





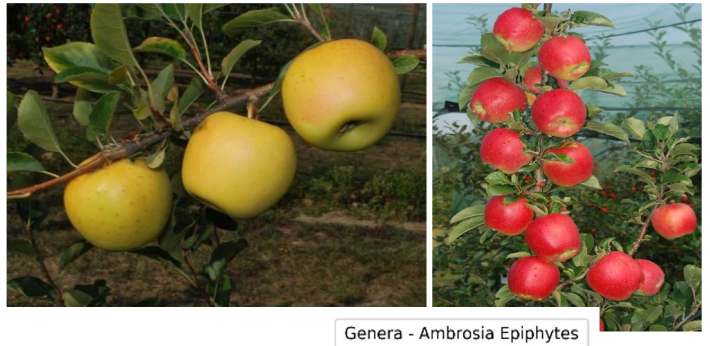
Guarnaccia et al., 2024

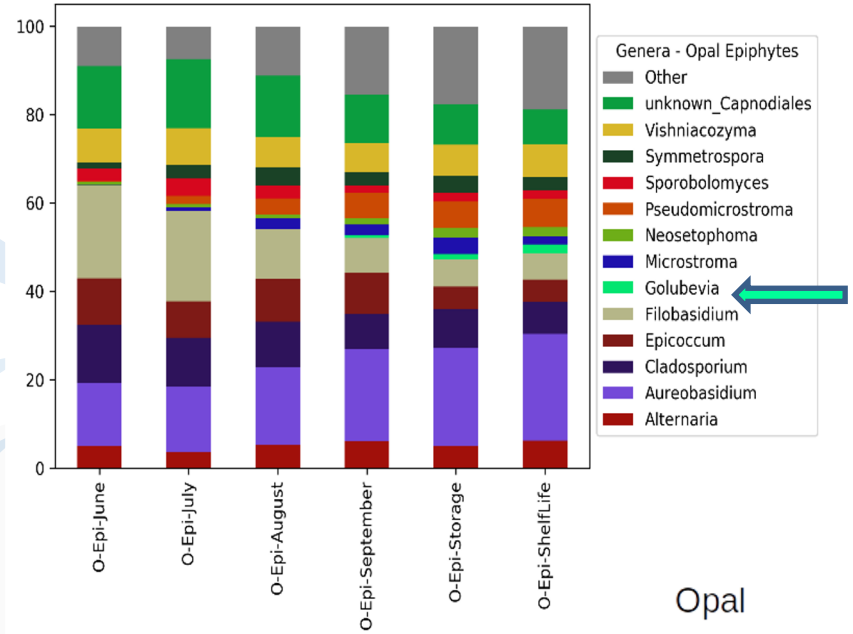
UNIVERSITÀ DI TORINO
DISAFA Università degli studi di Torino
Finanziato dall'Unione europea NextGenerationEU
Ministero dell'Università e della Ricerca
Italiadomani PIANO NAZIONALE DI RIPRESA E RESILIENZA
SUS-MIRRI.IT

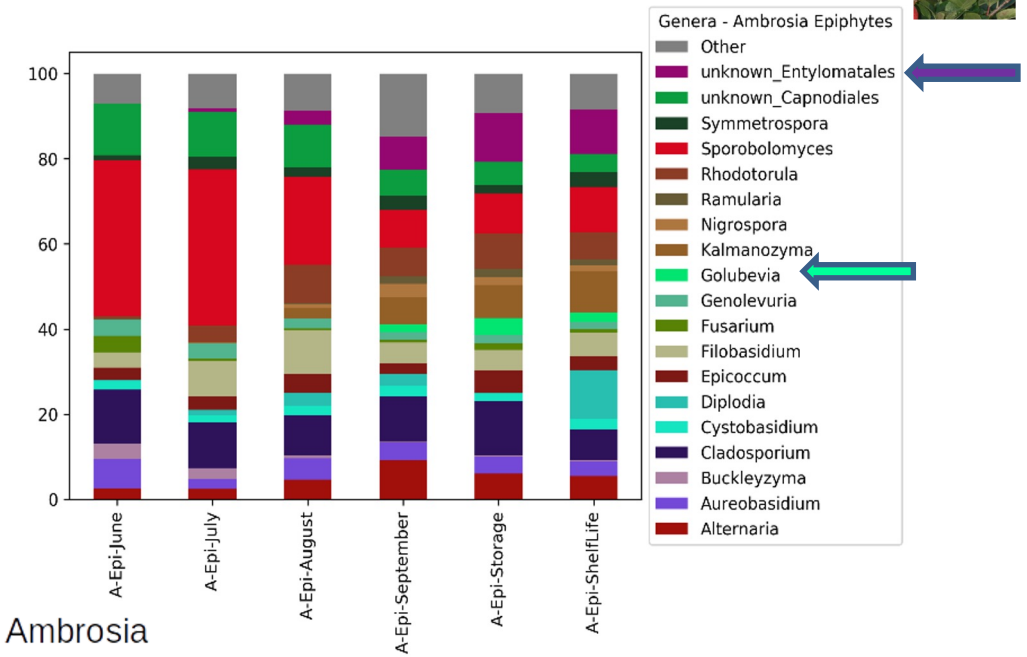
Identificazione a scopi epidemiologici analisi dei frutti

Due cultivars:
Opal (resistente ticchiolatura)
Ambrosia (suscettibile ticchiolatura)

- Comunità microbiche: ITS2 per funghi.
- Tessuti: cuticola (swabbing)
- 6 time-points: giugno, luglio, agosto, settembre, conservazione (60 d), shelf-life (10 d)
- 5 replicati biologici







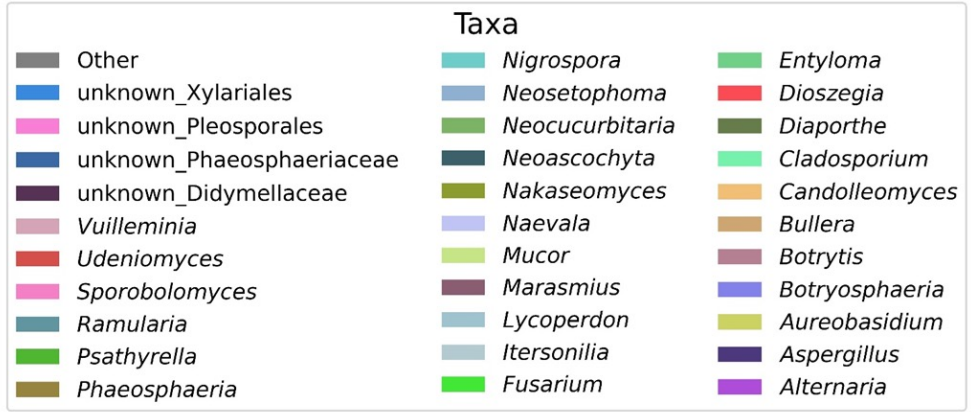
- *Golubevia,* in aumento da September, in entrambe le varietà.
- Entylomatales, solo su Ambrosia, da luglio.

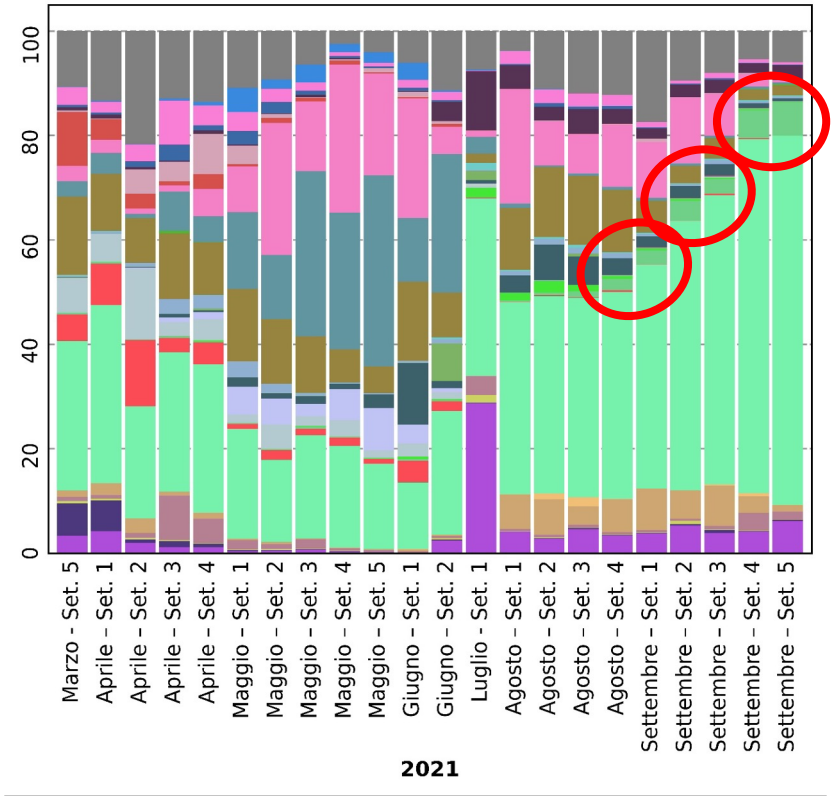
Identificazione a scopi epidemiologici analisi dei frutti

CAMPIONAMENTO: captaspore in meleto

Sequenziamento di ITS2

Rilevamento dei funghi responsabili della patina bianca (in particolare *Entyloma*) dopo agosto





Questionario:

https://docs.google.com/forms/d/e/1FAIpQLSdkti_qg5BWs8MwtI4Nk1MXWgySNY6K0zIpAk9s7OBXC9co5A/viewform?usp=sf_link

Vladimiro Guarnaccia
Associate Professor
Dept. Agricultural, Forest and Food Sciences (DISAFA)
AGROINNOVA - Interdepartmental Centre
University of Torino

vladimiro.guarnaccia@unito.it
Tel.: +39(0)116708018

UNIVERSITÀ DI TORINO
DISAFA Università degli studi di Torino
Finanziato dall'Unione europea NextGenerationEU
Ministero dell'Università e della Ricerca
Italiadomani PIANO NAZIONALE DI RIPRESA E RESILIENZA
SUS-MIRRI.IT