



Messa a punto di metodi speditivi per il controllo di organismi nocivi in vivaio

Nicola LUCHI¹, Emanuele NIGRONE¹, Lorenzo CENTRITTO¹, Francesco PECORI¹, Duccio MIGLIORINI¹, Giorgio INCROCCI², Alberto SANTINI¹

¹ *Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante, Consiglio Nazionale delle Ricerche (IPSP-CNR), Via Madonna del Piano, 10 - Sesto Fiorentino (Firenze);*

² *Agrilogica, Localita' Ferranti, 47, 55011, Altopascio (Lucca).*

PRESENTAZIONE DEI RISULTATI DEL PROGETTO AUTOFITOVIV

Giovedì 24 marzo 2022

Accademia dei Georgofili, Logge Uffizi Corti - Firenze

Le malattie delle piante sono dovute principalmente all'introduzione di **organismi invasivi** non nativi o all'emergere di un organismo nativo a seguito di **cambiamenti nelle condizioni climatiche o delle pratiche agronomiche**.

SPECIE INVASIVE

- ✓ L'aumento degli scambi commerciali facilita il movimento intenzionale e non intenzionale di specie oltre le barriere geografiche naturali
- ✓ Grave minaccia alla diversità biologica

CAMBIAMENTO CLIMATICO

- ✓ Estensione areale di diffusione dei parassiti;
- ✓ Aumento del numero di cicli (insetti);
- ✓ Variazione condizioni fisiologiche ospite (stress-idrico);
- ✓ Cambiamenti genetici dei parassiti (ibridazione).

Le ispezioni alle frontiere si concentrano su un numero limitato di organismi nocivi alle piante economicamente importanti, sulle liste di quarantena e anche in questo caso, principalmente limitate agli **esami visivi delle parti aeree della pianta**.

Impiego di tecniche di **diagnosi precoce** per evitare l'introduzione di organismi dannosi è quindi una delle migliori strategie per contenere i costi ambientali ed economici che ne potrebbero conseguire.

Applied Microbiology and Biotechnology (2020) 104:2453–2468
<https://doi.org/10.1007/s00253-020-10395-4>

MINI-REVIEW

Fast and reliable molecular methods to detect fungal pathogens in woody plants

Nicola Luchi¹  · Renaud Ioos²  · Alberto Santini¹ 

Scopo di questo lavoro è di adattare metodi molecolari di avanguardia al fine di ottenere una **diagnosi precoce e rapida dei principali patogeni** che potrebbero essere introdotti con il commercio delle piante.

Nello specifico le attività di ricerca hanno riguardato:

- a) Messa a punto di **metodi molecolari**, per una diagnosi precoce sulle piante in arrivo nei vivai;
- b) **Messa a punto di sistemi captaspore, combinati a metodi diagnostici molecolari**, per rilevare la presenza di oidi e ruggini nei centri di produzione delle aziende vivaistiche del partenariato.

NECESSITÀ DI ACCELERARE ULTERIORMENTE I PROCESSI DI CONTENIMENTO DI UNA MALATTIA

Osservazione di piante sintomatiche



Analisi di laboratorio



Identificazione della malattia e decisione delle misure di gestione

METODI MOLECOLARI:
Sono i migliori in termini di sensibilità e specificità;

Difficoltà:

- a) Necessitano un laboratorio attrezzato per essere applicati;
- b) Richiedono competenze specializzate.

LA TECNICA LAMP (Loop-mediated isothermal amplification)

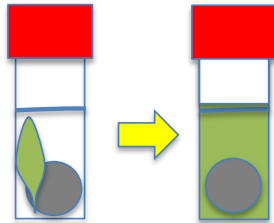
Diagnosi del DNA di
un patogeno
direttamente in
campo

1. Raccolta campioni



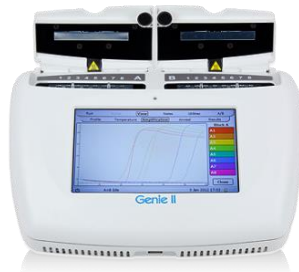
[2-5 minuti]

2. Estrazione DNA



[2-3 minuti]

3. Genie II



[30 minuti (16 campioni)]

ORIGINAL ARTICLE

Open Access

Real-time loop-mediated isothermal amplification: an early-warning tool for quarantine plant pathogen detection

Chiara Aglietti^{1,2}, Nicola Luchi^{1*}, Alessia Lucia Pepori¹, Paola Bartolini¹, Francesco Pecori¹, Aida Raio¹, Paolo Capretti² and Alberto Santini¹



Open Access 

Reports

Real-time loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of *Fusarium circinatum*

Dagmar Stehlíková^{1,2}, Nicola Luchi^{2,4}, Chiara Aglietti^{2,3}, Alessia Lucia Pepori², Julio Javier Diez⁴ & Alberto Santini²

ORIGINAL ARTICLE

Open Access

Rapid diagnostics for *Gnomoniopsis smithogilvyi* (syn. *Gnomoniopsis castaneae*) in chestnut nuts: new challenges by using LAMP and real-time PCR methods

Anna Maria Vettraino^{1†}, Nicola Luchi^{2†}, Domenico Rizzo³, Alessia Lucia Pepori², Francesco Pecori² and Alberto Santini²



Il **monitoraggio aerobiologico** si occupa del riconoscimento dei granuli pollinici e delle spore fungine presenti nell'aerosol biologico. Si effettua tramite apposite **stazioni di monitoraggio** che catturano o per impatto granuli pollinici, spore e particolati aerodiffusi in aria.

Negli ultimi anni la maggior parte delle patologie che stanno causando infezioni delle porzioni aeree delle piante in vivaio sono riconducibili a due grandi gruppi di patogeni: **le ruggini e gli oidi**.

Entrambe queste due classi sono **caratterizzate da organismi biotrofi** ovvero che hanno bisogno di ospiti vivi per nutrirsi.

Questo rende **difficile la loro coltivazione *in-vitro*** e la diagnosi.

La tassonomia complessa di oidi e ruggini

Il genere ***Erysiphe*** contiene più **di 800 specie** ed è il genere più grande delle Erysiphaceae (contiene più del 50% di tutte le specie di questa famiglia) (Takamatsu et al., 2015), mentre per le **ruggini** i generi *Puccinia* e *Tranzschelia* comprendono più di **40 specie**

Rotating Arm Spore Traps ROTTRAP 120 (RAST 120) [Milon Dvorák (BoršovnadVltavou, Czech Republic)]



Estrazione DNA

Real-time PCR

Quantificazione inoculo

Le sonde molecolari

Sono state disegnate due **sonde molecolari** in real-time PCR (qPCR): una per gli oidii e l'altra per le ruggini. Tali sonde sfruttano la chimica **TaqMan MGB**, e, una volta intercettato il DNA del patogeno, si ibridano sulla porzione della regione target del gene.

Nel corso della reazione di amplificazione, l'enzima *Taq*-polimerasi degrada la sonda producendo un **segnale fluorescente** che è direttamente proporzionale alla quantità di DNA del patogeno rilevato

Per mezzo della **curva standard** è possibile quantificare, per ogni campione, il DNA del patogeno target.

DISEGNO DI SONDE MOLECOLARI PER OIDI E RUGGINI

Analisi sequenze gene **Elongation-factor (Ef-1a)** (*Erysiphe* e *Tranzschelia*)
[Banca dati 'National Center for Biotechnology Information']



Disegno sonde TAQMAN MGB (*Primer Express*)

Erysiphe e *Tranzschelia*

Le **specificità delle sonde** disegnate è stata saggiata su campioni di DNA estratti da erbario appartenenti a diverse specie di oidio e ruggini

Le sonda disegnata per *Erysiphe* e per *Tranzschelia*, **sono in grado di rilevare le diverse specie presenti in ciascun genere**. Non è stata invece osservata alcuna amplificazione per altre specie fungine.

DUPLEX QPCR

E' stato messo a punto un dosaggio DUPLEX per rilevare la presenza simultanea di ruggini e oidi, nello stesso volume di reazione amplificazione

Real-time PCR: aerobiologia di *Ruggini e Oidi*



Campionamento settimanale
(da Luglio 2020 a Giugno
2021)



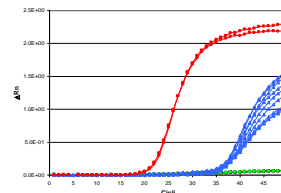
Estrazione del DNA dai
nastri



Real time PCR



Quantificazione inoculo
(pg DNA di fungo)
NEL TEMPO



Monitoraggio in vivaio

Impianto a terra

(*Magnolia* - 2 trappole)

(*Quercus* - 2 trappole)



Piante in contenitore

(*Prunus* - 2 trappole)



Piazzale di carico

(1 trappola)



Conclusioni

- La real-time PCR e la LAMP permettono di **ridurre i tempi della diagnosi**. La tecnica LAMP permette di **rilevare la presenza di un patogeno direttamente in campo**, senza bisogno di strumentazione da laboratorio.
- Lo sviluppo di nuovi sistemi di trappole insieme all'applicazione di tecniche molecolari ha permesso di **identificazione dei periodi di maggiore sporulazione** di questi patogeni, limitando l'uso di antiparassitari ai periodi in cui sono veramente necessari, razionalizzandone i costi e l'uso .
- Attraverso l'utilizzo di questi strumenti è possibile indicare anche delle **linee guida per la gestione delle avversità** attraverso un uso limitato di prodotti chimici. Tutto questo risulta estremamente importante in un'ottica di sostenibilità ambientale.