

Incontro:
'Noci italiane, un'eccellenza da tutelare'
29 Novembre 2022

Diagnosi e genomica per conoscere e controllare *Phytophthora* spp., in particolare *P. cinnamomi*

Anita Haegi

CREA-Centro di Ricerca Difesa e Certificazione (DC), Roma

- 1) Diagnosi di *Phytophthora* spp./ *Phytophthora cinnamomi*
- 2) Identificazione di effettori in *Phytophthora cinnamomi* tramite genomica e trascrittomica
- 3) Studio dell'eziologia della patologia delle «Noci Nere» tramite 'Metabarcoding'

La ***Phytophthora cinnamomi*** è un oomicete principale causa del deperimento del noce

La *P. cinnamomi* è uno dei fitopatogeni più dannosi al mondo, ha infatti una distribuzione mondiale e più di 5.000 piante ospiti

Il deperimento del noce

La malattia parte dalle **radici**, che mostrano aree necrotiche da cui possono fuoriuscire essudati nerastri.



Dalle radici il patogeno passa al **colletto**, qui i sintomi sono rappresentati da vaste aree necrotiche di colore marrone scuro tendente al nero dalla caratteristica forma a fiamma.

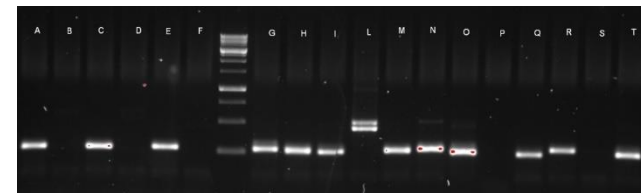


La **chioma** presenta microfillia, rarefazione, clorosi e disseccamenti. In generale la pianta mostra i sintomi dello stress idrico e la crescita è ridotta.



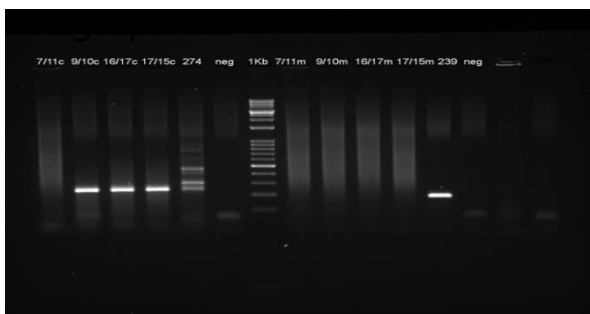
1) Diagnosi del genere *Phytophthora* spp.

Messa punto di una **nested-PCR**, particolarmente sensibile, in grado di rilevare la presenza di qualsiasi *Phytophthora* spp. nel terreno. Utile per l'individuazione e la distribuzione di *Phytophthora* spp. all'interno di un impianto.



P. cinnamomi

P.

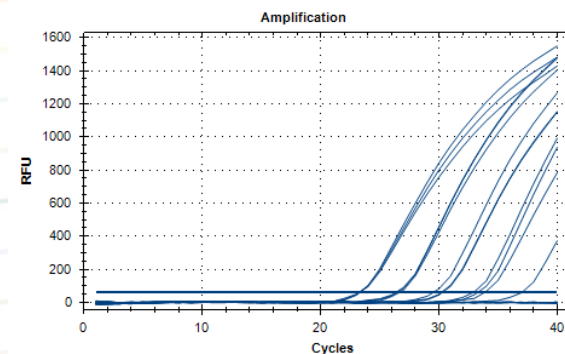


2) Diagnosi di specie di *Phytophthora*

Partendo dalla stessa estrazione di DNA da terreno, i campioni che sono risultati positivi per la presenza di *Phytophthora* spp. possono essere analizzati con un altro tipo di **nested-PCR** per identificarne la specie di *Phytophthora*.

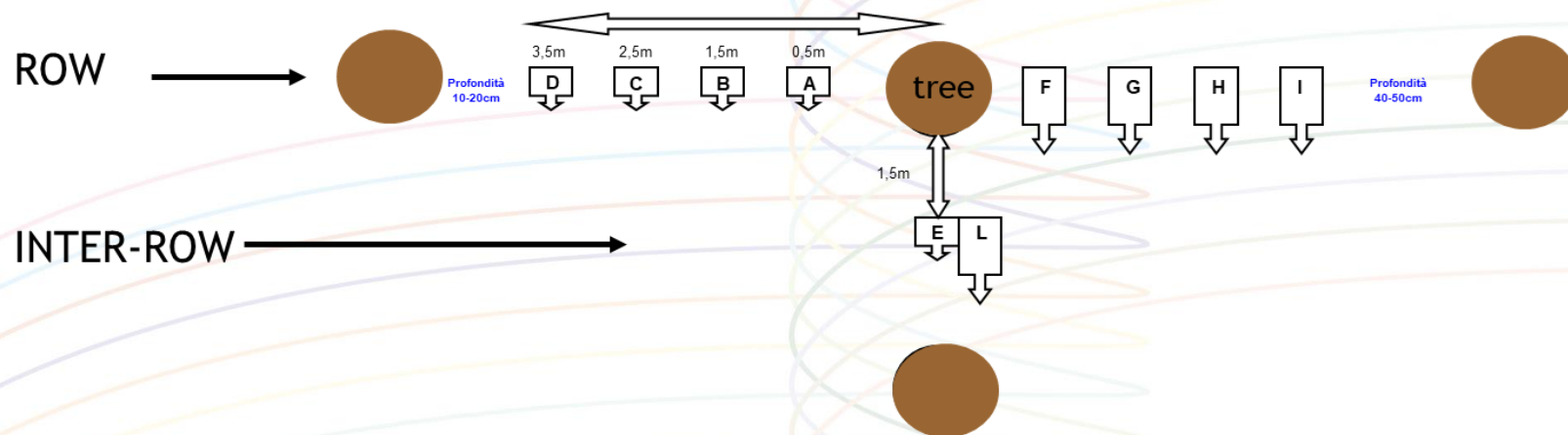
3) Diagnosi quantitativa di *P. cinnamomi*

Messa a punto di un metodo di diagnosi **quali-quantitativa** specifica per *P. cinnamomi* a mezzo di **Real-Time PCR**. Permette di calcolare il livello di infestazione nel terreno.



Diagnosi di *Phytophthora* spp./ *P. cinnamomi* nel terreno rappresenta una diagnosi precoce a carattere **preventivo**.

Sono stati condotti studi per individuare il sistema più significativo di campionamento del terreno: lungo le file e le interfile dell'impianto sono stati condotti campionamenti a diverse profondità e diverse distanze dagli alberi.



Le migliori condizioni di campionamento sono risultate essere ad una distanza di 50 cm dall'albero ai 4 punti cardinali, alle due profondità di 20 cm e 40 cm.

Quando integrate queste metodiche riescono a dare il quadro completo dell'infezione da *Phytophthora* nell'area di coltivazione del noce.

1) identificazione del **genere**
Phytophthora spp.

2) identificazione di diverse **specie**
di *Phytophthora*

3) identificazione e
quantificazione di
Phytophthora cinnamomi

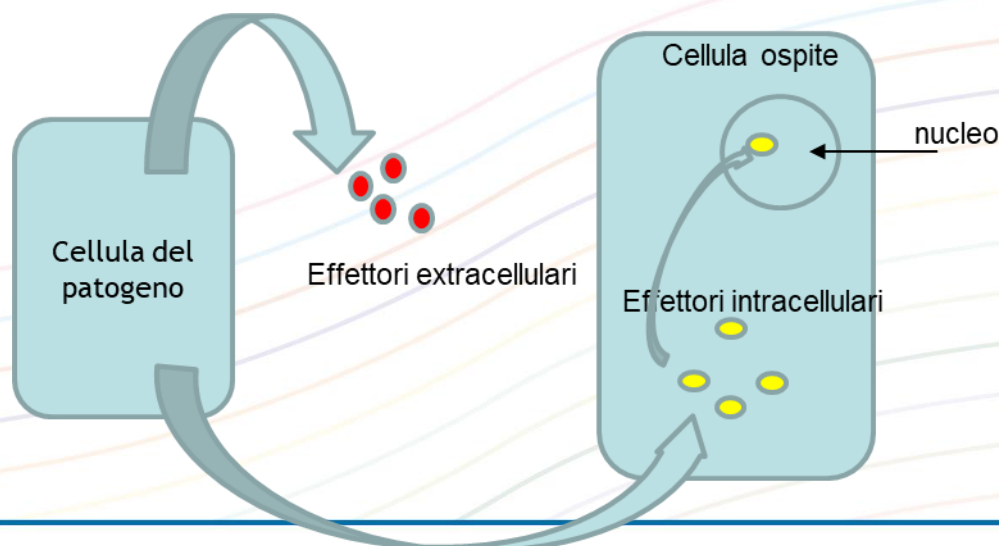
Questo approccio è stato utilizzato nel supporto nella gestione fitosanitaria degli impianti nocicoli, per la corretta identificazione del patogeno causale della malattia, per individuare aree infette o indenni degli impianti, per assicurare l'assenza del patogeno nel caso di nuovi impianti, etc.

Studio approfondito per ampliare la conoscenza del patogeno *Phytophthora cinnamomi* e della malattia che esso causa tramite un approccio molecolare basato sul sequenziamento di nuova generazione (NGS= Next Generation Sequencing) comprendente il sequenziamento dell'intero genoma (genomica) del patogeno e delle sequenze espresse (trascrittomica) dal patogeno durante l'infezione, allo scopo di individuare le basi molecolari dell'interazione ospite-patogeno.

Puntato l'attenzione sui geni codificanti effettori determinanti della malattia

Effettori

Questi sono fattori che nell'insieme interferiscono con la vita della pianta al fine di creare un ambiente favorevole per l'infezione del patogeno. In particolare interferiscono con le reazioni di difesa che la pianta mette in atto contro il patogeno.



In *Phytophthora* spp. sono noti due classi di effettori traslocati all'interno della cellula ospite:

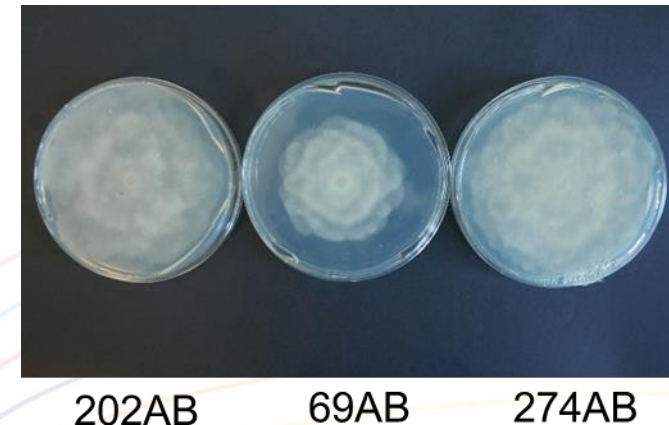
la famiglia degli **RXLR**

la famiglia dei **'Crinklers'**.

1) Sequenziamento del genoma di *P.cinnamomi*

i genomi i tre isolati di *P. cinnamomi* sono stati sequenziati con il metodo Illumina paired-end

Le reads ottenute sono state assemblate sulla base di un genoma di riferimento presente in Banca Dati del ceppo MP94-48 di *P. cinnamomi*



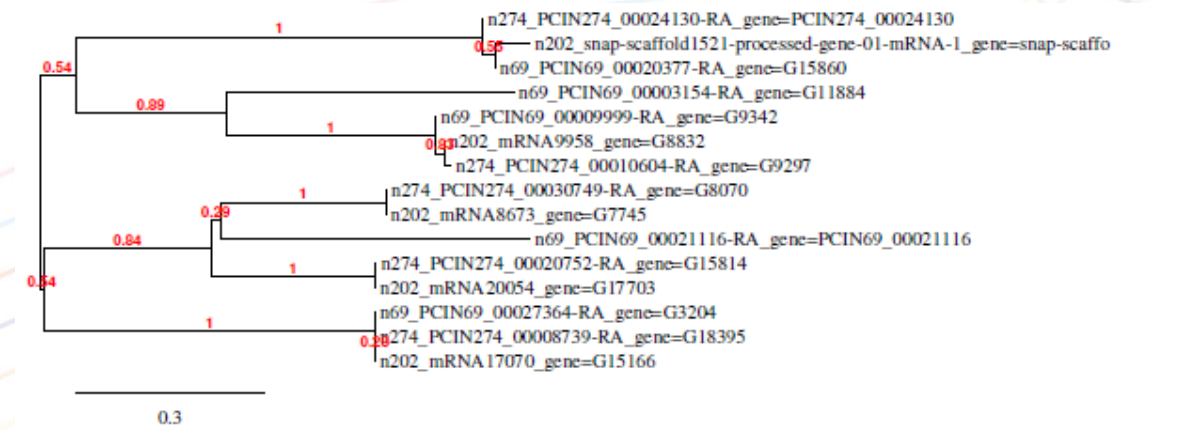
Tutti e tre i genomi sono dell'ordine di misura di 53 Mbp, come il ceppo di riferimento

In seguito è stata completata **l'annotazione genica** dei tre ceppi con procedimento sia ab initio che reference-guided su dati di RNA-Seq presenti in Banca Dati. Sono stati annotati tra i 25.000 e i 26.000 geni per ogni ceppo, un numero particolarmente alto per oomiceti ma in linea con *P. cinnamomi*.

I geni che codificano per gli RXLR e i 'Crinklers' sono stati ricercati nei geni annotati degli isolati in studio grazie alle loro sequenze conservate, da questa analisi è risultato che:

Isolato	CRN	RXLR
69AB	18	254
202AB	21	295
274AB	19	263

Molti di questi geni sono ortologhi fra di loro, eseguendo una analisi cluster è possibile raggruppare le proteine in base alla loro similarità, come è mostrato qui di seguito per i geni Crinkler individuati:



Interazione pianta-patogeno

2) Analisi dell'espressione genica durante l'interazione

A) Analisi RNA-Seq

- ▲ Inoculazioni artificiali, su cimali di un anno staccati dalla pianta suscettibile (*J.regia*), con i tre ceppi in studio *AB69*, *AB202* e *AB274* di *P. cinnamomi*
- ▲ Prelievo campioni dopo 1, 3 e 6 DPI (Days Post Inoculation)



1 DPI



3 DPI



6 DPI

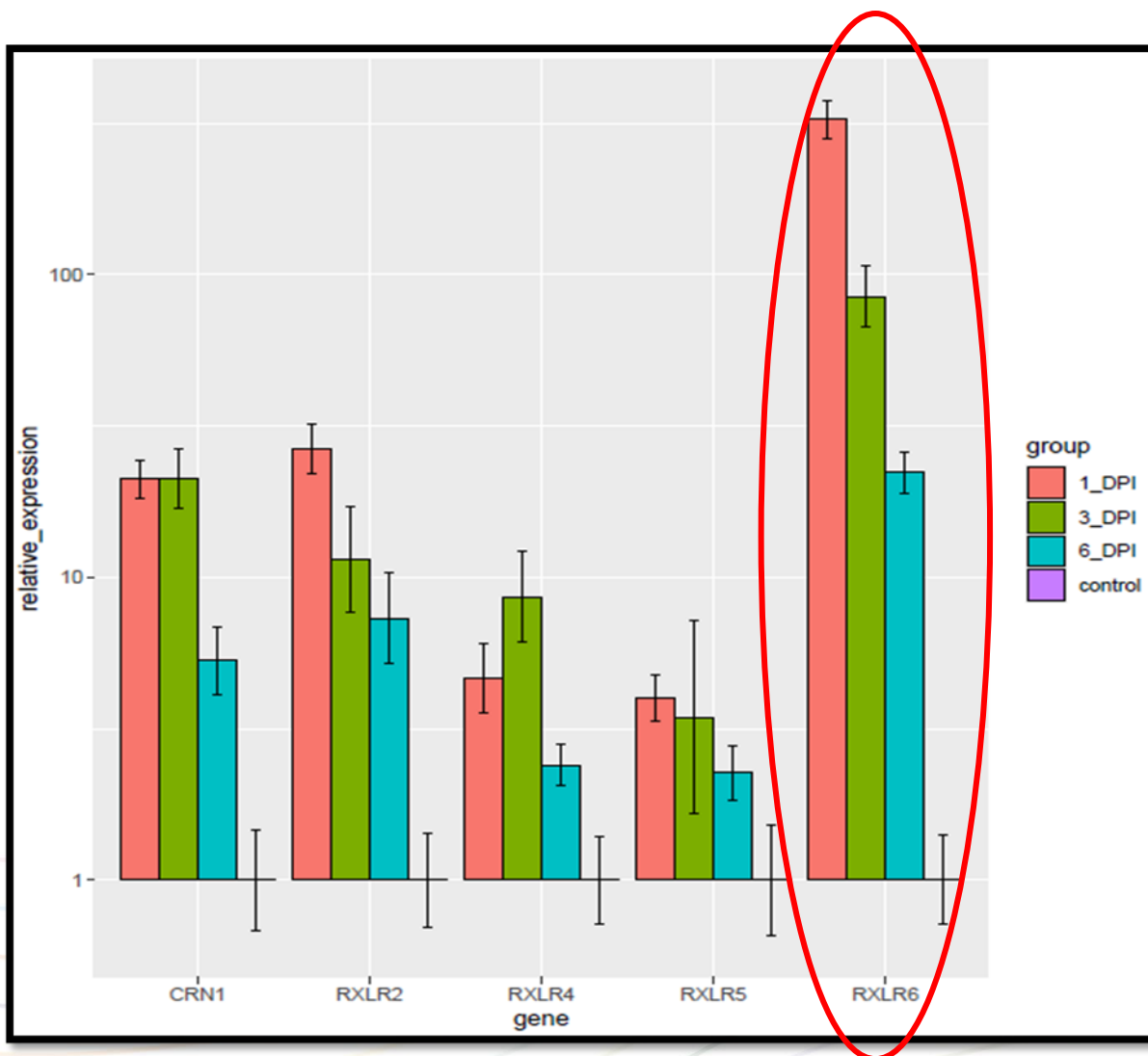
- ▲ Estrazione RNA
- ▲ Sequenziamento dei trascritti a RNA con Illumina

Sono stati analizzati tutti i trascritti espressi dal patogeno in pianta durante l'interazione. In particolare si è focalizzata l'attenzione sui geni degli effettori Crn e RXLR individuati dalle analisi genomiche.

Questa analisi ha permesso di individuare quei geni espressi più precocemente e in elevate quantità e quindi di selezionare 2 geni Crn e 6 RXLR.

Gene Putativo	Sigla	Classe
Pc202_16896-RA CRN <i>crn1</i> like	CRN_1	CrinKlers
Pc202_16374-RA CRN	CRN_2	CrinKlers
Pc202_16058-RA RxLR	RxLR_1	RxLR
Pc202_15481-RA RxLR	RxLR_2	RxLR
Pc202_17779-RA RxLR	RxLR_3	RxLR
Pc202_06895-RA RxLR	RxLR_4	RxLR
Pc202_05748-RA RxLR	RxLR_5	RxLR
Pc202_10366-RA RxLR	RxLR_6	RxLR

B) Analisi in Real-Time PCR



Sui geni selezionati sono stati disegnate le coppie di primers per definire meglio la loro espressione durante l'interazione tramite Real-Time PCR. Questo è un metodo molto sensibile e preciso per la quantificazione dell'espressione genica.

I geni effettori CRN_2, RxLR_1 e RxLR_3 non hanno manifestato espressioni rilevanti in nessuno dei tre isolati studiati durante l'interazione, lasciando supporre un loro ruolo marginale nella patogenesi in noce.

Gli effettori CRN_1, RxLR_2, RxLR_4, RxLR_5 e RxLR_6 invece hanno mostrato alti livelli di espressione, possibili candidati come determinanti per il patogeno nell'istaurare la malattia durante l'interazione con noce. In particolare RxLR_6

In relazione alla nuova problematica segnalata nei noceti del Veneto legata alla formazione di mali parzialmente o completamente neri, è stato anche approntato un esperimento al fine di identificare gli agenti eziologici di questo fenomeno e comprendere a quale stadio fenologico questi agenti infettino la pianta.

DISEGNO SPERIMENTALE

Nella stagione 2019, in due diversi noceti del Veneto, erano stati eseguiti 4 set di campionamenti di noci a diversi stadi fenologici:

I Fase – Inizio di giugno

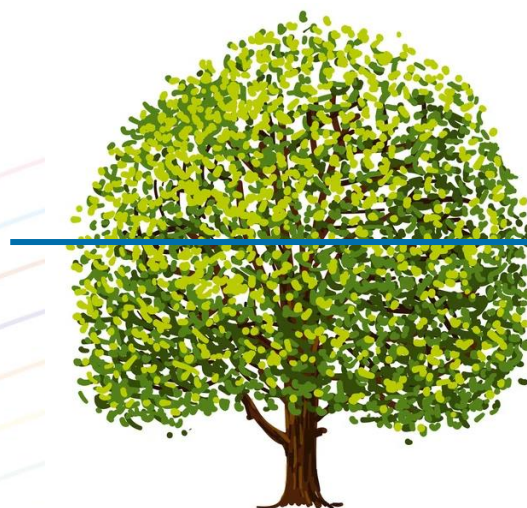
II Fase – Inizio di luglio

III Fase – Inizio di agosto

IV Fase – inizio di settembre

-2 noceti nel veneto

-6 piante ogni noceto



12 mali



Analisi
morfologica

Analisi
molecolare

12 mali



Analisi
morfologica

Analisi
molecolare

In entrambi i casi è stato prelevato materiale vegetale solo all'interno delle noci in formazione in maniera sterile

I campioni così raccolti, in seguito a estrazione di DNA, sono stati sottoposti ad analisi

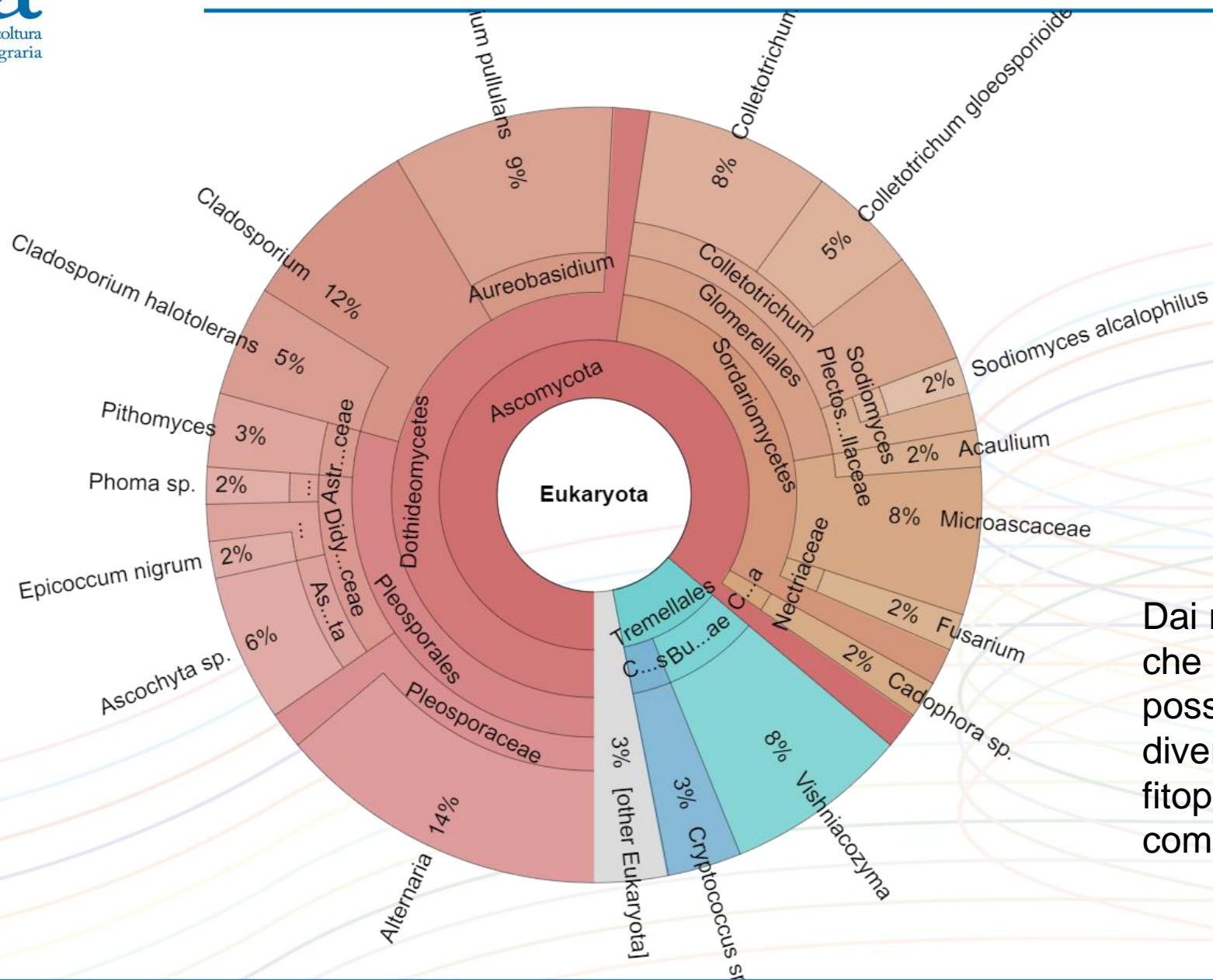
METABARCODING

Il metabarcoding è una tecnica basata sul sequenziamento massivo (NGS) che permette l'identificazione di organismi presenti in un campione grazie al sequenziamento di marker genetici (barcode) che forniscono informazioni tassonomiche.

Sono stati analizzati in questo modo 72 campioni del noceto A e 82 campioni del noceto B comprendenti repliche biologiche.

Questi studi danno indicazioni su quelle popolazioni fungine potenzialmente patogene, che si trovano all'interno dei noceti e, in quelle particolari fasi fenologiche, riescono ad entrare nella noce in formazione dando origine, in presenza delle condizioni favorevoli, al fenomeno delle “noci nere”.





Dai risultati è subito emerso che già nella I Fase possono essere presenti diversi funghi potenzialmente fitopatogeni come: **Colletotrichum** spp., **Alternaria** spp., **Fusarium** spp.).

Nella stagione successiva (2020) sono stati eseguiti dei campionamenti in una Fase ancora più precoce corrispondente alle Gemme (marzo/ aprile) in diverse località del Veneto e sottoposti ad analisi metabarcoding.

I risultati danno indicazioni sulle popolazioni fungine presenti a quella data all'interno del noceto in studio.

Patogeno	Azienda 1			Azienda 2		Azienda 3			Azienda 4		
Eukaryota;Ascomycota;Sordariomycetes;Glomerellales;Glomerellaceae;Colletotrichum;Colletotrichum acutatum	0	2	0	1135	901	1732	939	1534	0	10	602
Eukaryota;Ascomycota;Sordariomycetes;Glomerellales;Glomerellaceae;Colletotrichum;Colletotrichum aeshynomenes	0	0	0	63	0	0	10	10	1	4	53
Eukaryota;Ascomycota;Sordariomycetes;Glomerellales;Glomerellaceae;Colletotrichum;Colletotrichum camelliae	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Eukaryota;Ascomycota;Sordariomycetes;Glomerellales;Glomerellaceae;Colletotrichum;Colletotrichum coccodes	0	0	0	15	1	4	10	12	0	0	0
Eukaryota;Ascomycota;Sordariomycetes;Glomerellales;Glomerellaceae;Colletotrichum;Colletotrichum dematium	0	0	0	5	0	2	0	3	0	0	0
Eukaryota;Ascomycota;Sordariomycetes;Glomerellales;Glomerellaceae;Colletotrichum;Colletotrichum destructivum	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0
Eukaryota;Ascomycota;Sordariomycetes;Glomerellales;Glomerellaceae;Colletotrichum;Colletotrichum fragariae	0	0	0	8	0	0	0	0	0	1	3
Eukaryota;Ascomycota;Sordariomycetes;Glomerellales;Glomerellaceae;Colletotrichum;Colletotrichum gloeosporioides	0	0	0	128	26	57	307	42	4	1	172
Eukaryota;Ascomycota;Sordariomycetes;Glomerellales;Glomerellaceae;Colletotrichum;Colletotrichum lagenaria	0	0	0	701	1375	2649	7915	6180	23	142	93
Eukaryota;Ascomycota;Sordariomycetes;Glomerellales;Glomerellaceae;Colletotrichum;Colletotrichum lupini	0	0	0	64	24	48	32	63	0	0	13
Eukaryota;Ascomycota;Sordariomycetes;Glomerellales;Glomerellaceae;Colletotrichum;Colletotrichum sp.	0	0	0	50	0	28	21	25	0	0	9
Eukaryota;Ascomycota;Sordariomycetes;Glomerellales;Glomerellaceae;Colletotrichum;Colletotrichum sp. BBA71320	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Eukaryota;Ascomycota;Sordariomycetes;Glomerellales;Glomerellaceae;Colletotrichum;Colletotrichum spinaciae	0	0	0	0	1	0	1	3	0	0	0
Eukaryota;Ascomycota;Sordariomycetes;Glomerellales;Glomerellaceae;Colletotrichum;Colletotrichum sublineola	0	0	0	0	0	1	3	0	0	0	0
Eukaryota;Ascomycota;Sordariomycetes;Glomerellales;Glomerellaceae;Colletotrichum;Colletotrichum trifolii	0	0	0	3	0	1	1	0	0	0	0
Eukaryota;Ascomycota;Sordariomycetes;Glomerellales;Glomerellaceae;Colletotrichum;Colletotrichum truncatum	0	0	0	35	10	15	22	35	0	0	0
Eukaryota;Ascomycota;Sordariomycetes;Glomerellales;Glomerellaceae;Colletotrichum;unkn. Colletotrichum(g)	0	0	0	2232	1501	2364	2266	2618	9	28	1056

Grazie per l'attenzione