UNIVERSITÀ DI TORINO

Ruolo di *Phytopythium vexans* e della sommersione nello sviluppo della moria del kiwi

Davide Spadaro

DISAFA

AGRINNOVA

PROGETTO Ager AGROALIMENTARE E RICERCA

FONDAZIONI IN RETE PER LA RICERCA AGROALIMENTARE

Moria del kiwi o Kiwi Vine Decline Syndrome (KVDS)









Parte epigea:

- Necrosi fogliare
- Caduta delle foglie o filloptosi
- Avvizzimento dei rametti
- Morte della pianta

Parte ipogea:

- Scomparsa delle radici secondarie
- Blocco dei tessuti vascolari
- Degradazione del cortex (parte esterna) radicale

I sintomi sono più evidenti in estate.

Moria del kiwi: una sindrome multifattoriale

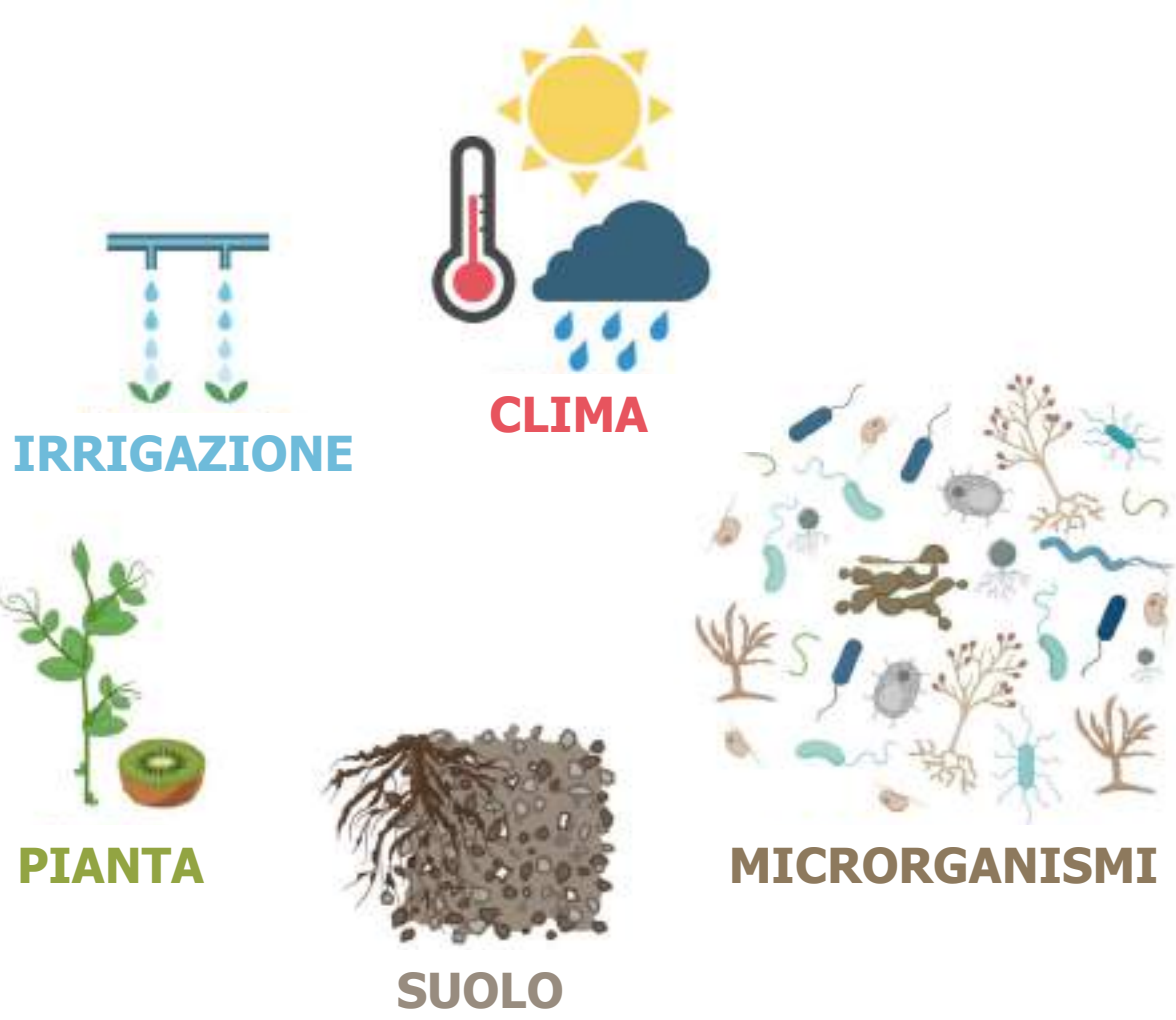
È causata dalla combinazione di stress biotici e abiotici

FATTORI BIOTICI

- **Suscettibilità della pianta**, causata da anossia delle radici e dal fabbisogno evapotraspirativo
- **Microorganismi** associati alla moria sono patogeni presenti nel suolo e coinvolti nel marciume radicale

FATTORI ABIOTICI

- **Suolo compatto:** bassa porosità
- Basso livello di **materia organica** nel suolo
- **Sommersione**, a causa di eccessive precipitazioni o irrigazione
- Picco di sintomi con **alte temperature** quando la traspirazione è più elevata

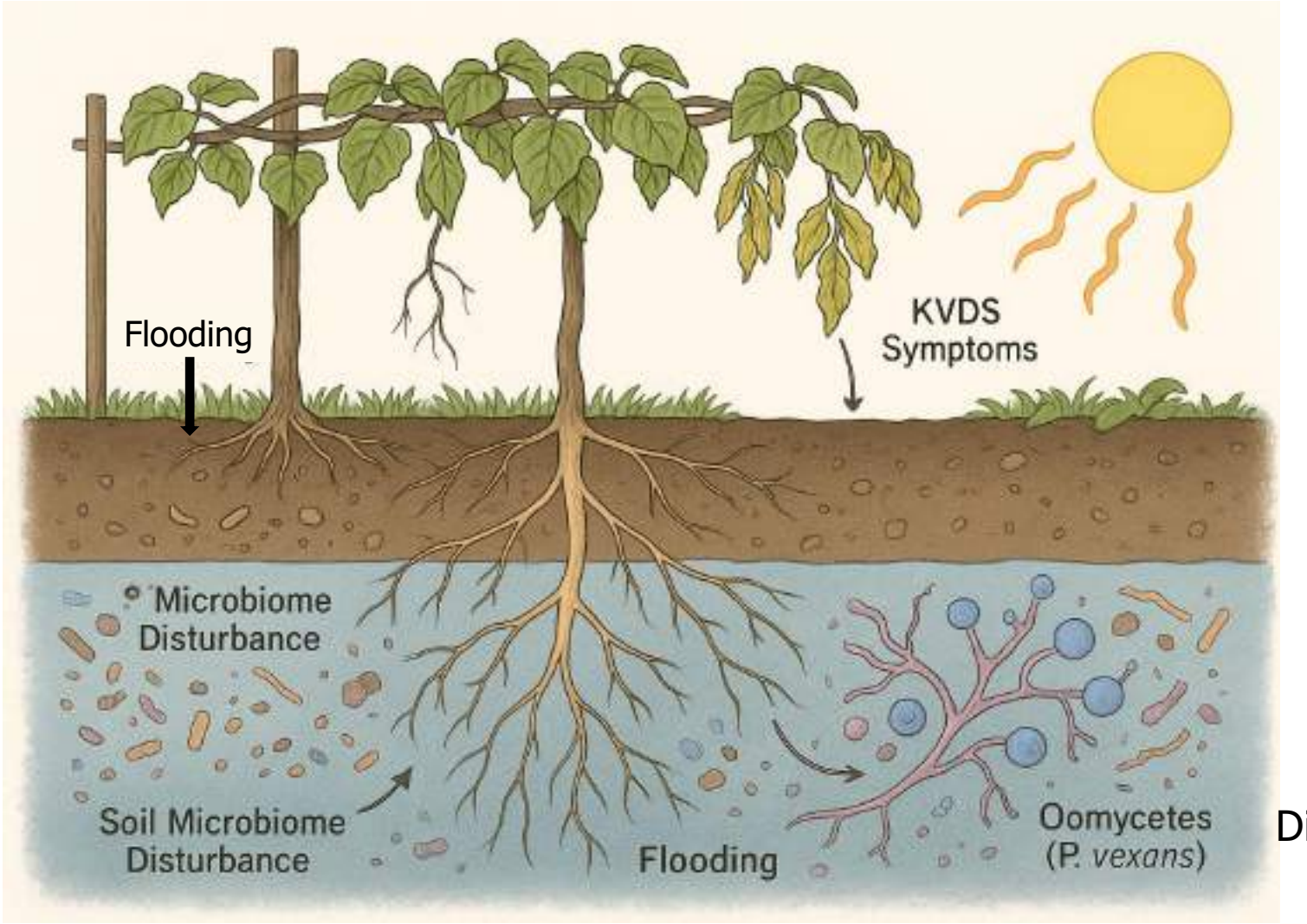


Created in https://BioRender.com

Quattro step per capire la moria del kiwi

STEP 1
Isolamento e caratterizzazione

STEP 2
Profilo del microbioma radicale e rizosferico



STEP 3
Studi di trascrittomica: le risposte della pianta al patogeno e alla sommersione

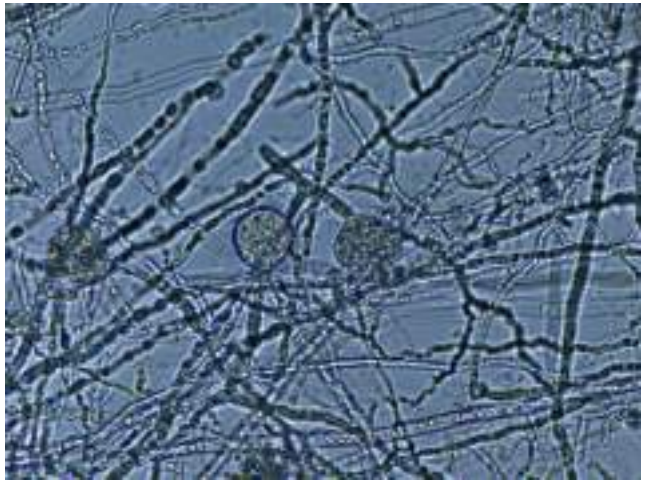
STEP 4
Diagnosi e rilevamento

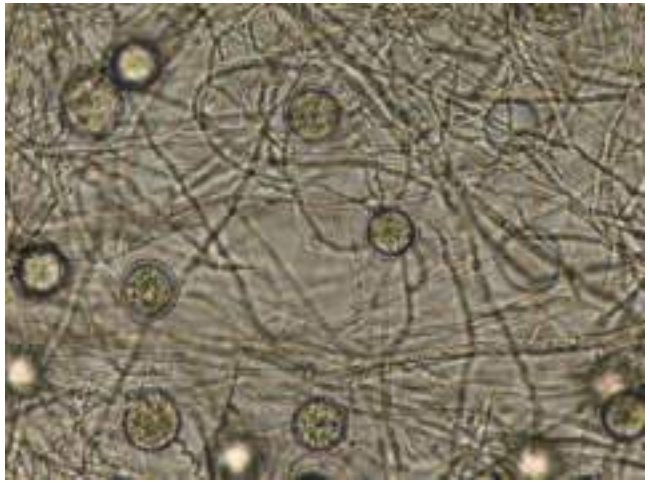
STEP 1 - Isolamento da radici colpite



Isolamento ed identificazione di oomiceti associati alla moria da radici di piante sintomatiche







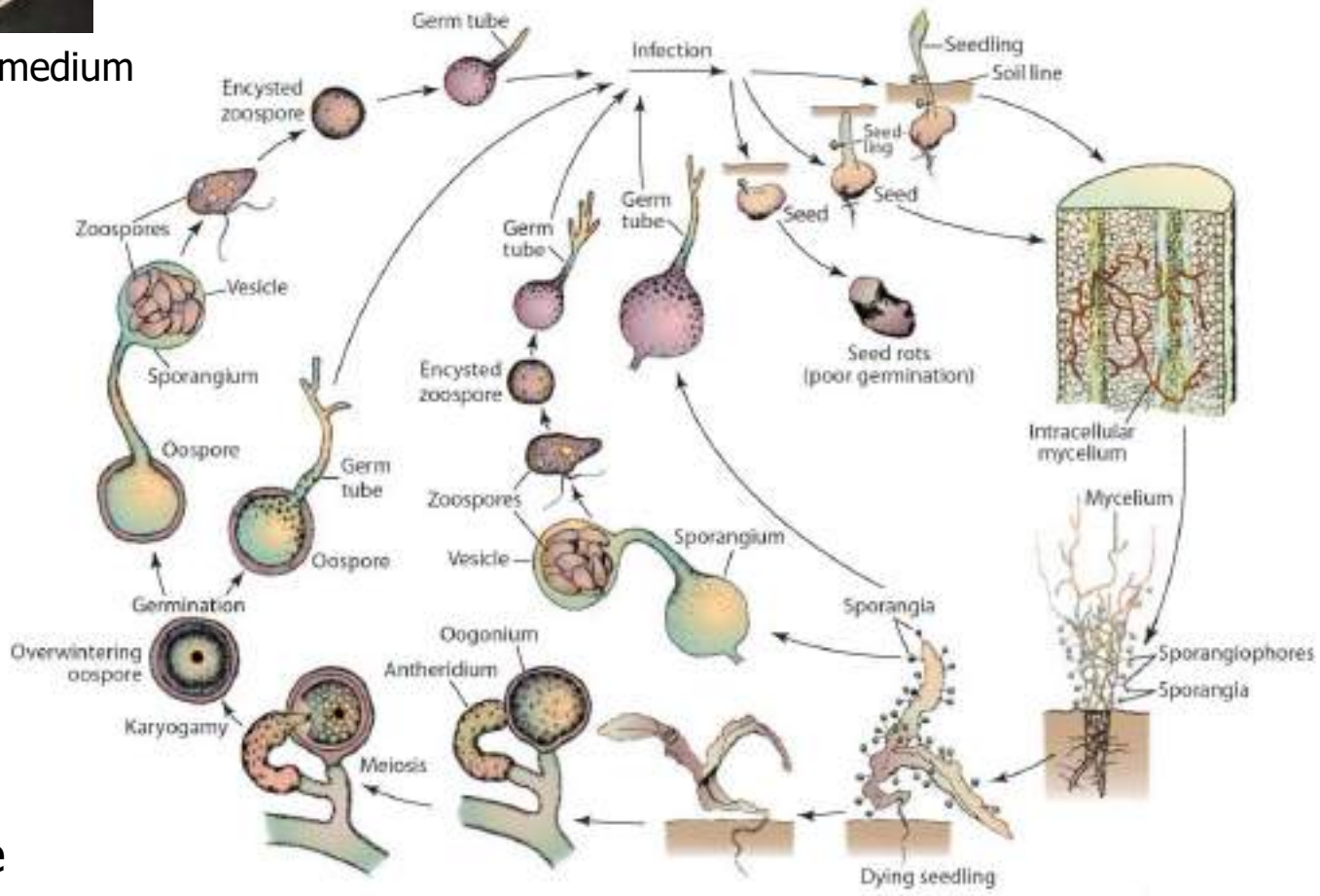
Identificazione morfologica al microscopio

Caratteristiche delle Pythiaceae



Phytopythium vexans isolated from kiwi roots on selective medium

- Ordine: Pythiales
- Causano marciumi radicali e deperimento delle piante
- Ciclo vitale diplonte (2n)
- Nei tessuti vegetali infetti sono differenziate le **oospore**
- La riproduzione asessuata avviene mediante zoospore biflagellate rilasciate con l'acqua
- La dispersione delle zoospore avviene spostando suolo infetto o con schizzi d'acqua e/o irrigazione



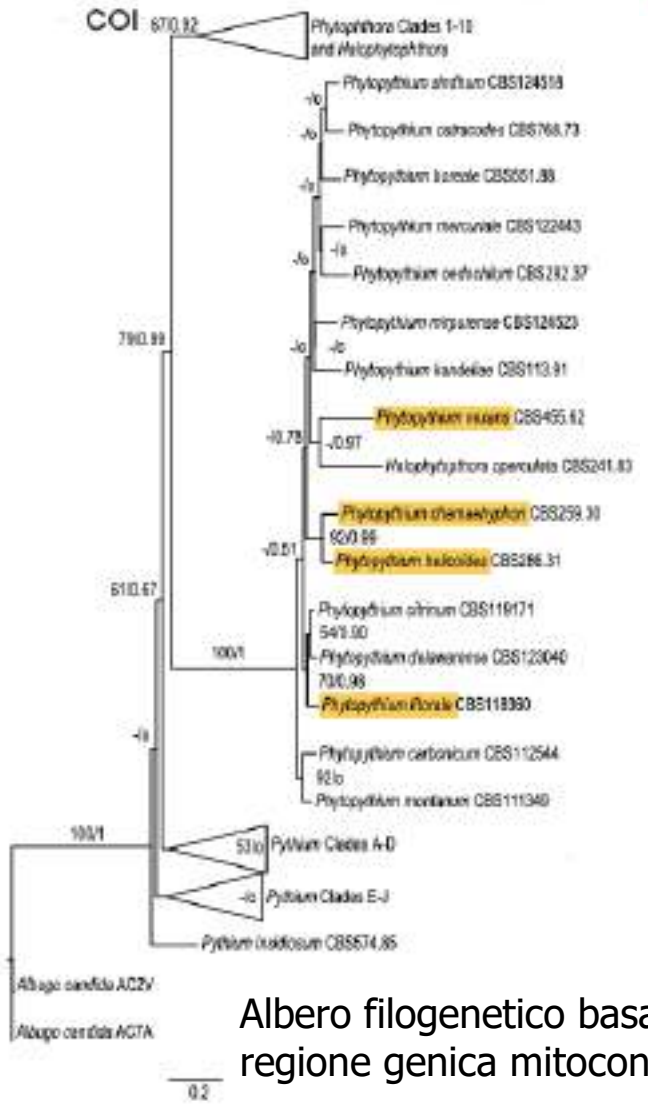
Il genere *Phytopythium*

- *Phytopythium* è un genere proposto per la prima volta nel 2008 e pubblicato nel 2010 (Bala et al., 2010).

- De Cock et al. (2015): il clade K di *Pythium* rappresenta un genere monofiletico chiamato *Phytopythium,* sulla base dei geni COI, LSU rRNA, SSU rRNA.

Mandarin	Soybean	Citrus	Grapevine	Cassava	Avocado	Cocoa	Corn
P. helicoides China, 2016	*Phytopythium* spp. North America, 2017	*P. vexans* *P. mercuriale* Tunisia, 2017	*P. vexans* South Africa, 2018	*Phytopythium* spp. Brazil, 2018	*P. vexans* Canary island, 2018	*P. chamaehyphon*, *P. vexans*, *P. helicoides* Colombia, 2021	*P. helicoides* China, 2021

Peach	Strawberry	Apple	Plane	Durian	Pear	Taro	Almond
P. helicoides America, 2019	*P. helicoides* America, 2019	*P. litorale* Turkey, 2020 Morocco, 2020	*P. litorale* Turkey, 2020	*P. vexans* Vietnam, 2020	*P. vexans* Morocco, 2021	*P. chamaehyphon* America, 2022	*P. vexans* Spain, 2022



Albero filogenetico basato sulla regione genica mitocondriale COI

Fonte: De Cock et al., 2015

Caratteristiche morfologiche

- Morfologicamente *Phytopythium* rappresenta un intermedio tra *Phytophtora* e *Pythium*

- Tratti identificativi:

- sporangi subglobosi non-papillati
- anteridi cilindrici e lobati



Sporangi



Anteridi con costrizioni definite



Anteridi bilobati

Fonte: De Cock et al., 2015

Patogenicità e riproduzione dei sintomi





Inoculo con *Phytopythium* spp.



Testimone sano





(0) Pianta sana



(1) Primi appassimenti



(2) Progressione dell'appassimento e disseccamenti basali



(3) Progressione del disseccamento fogliare e primi accartocciamenti



(4) Foglie completamente secche e accartocciate

DISEASE NOTES

First Report of *Phytopythium vexans* Causing Decline Syndrome of *Actinidia deliciosa* 'Hayward' in Italy

S. Prencipe, F. Savian, L. Nari, P. Ermacora, D. Spadaro, and M. Martini

Affiliations

Published Online: 12 May 2020 | https://doi.org/10.1094/PDIS-10-19-2101-PDN

Pathogenicity of Phytopythium chamaehyphon: a new player in Kiwifruit Vine Decline Syndrome of Actinidia chinensis var. deliciosa (A. Chev.) A. Chev. 'Hayward' in Italy

Francesco Savian, Simona Prencipe, Noemi Filippini, Luca Nari, Marta MARTINI, Paolo Ermacora, and Davide Spadaro

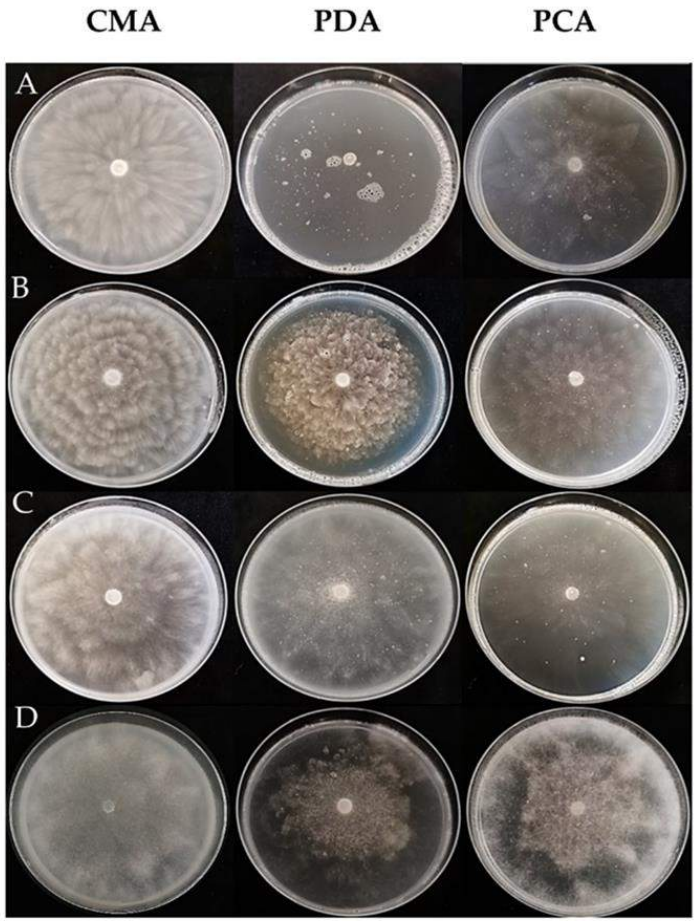
Published Online: 20 Apr 2021 | https://doi.org/10.1094/PDIS-01-21-0143-SC

Oomiceti associati alla moria in Piemonte

microorganisms

Characterization of *Phytopythium* Species Involved in the Establishment and Development of Kiwifruit Vine Decline Syndrome

by Simona Prencipe [1], Giada Schiavon [1,2], Marco Rosati [1,2], Luca Nari [3], Leonardo Schena [4] and Davide Spadaro [1,2,*]



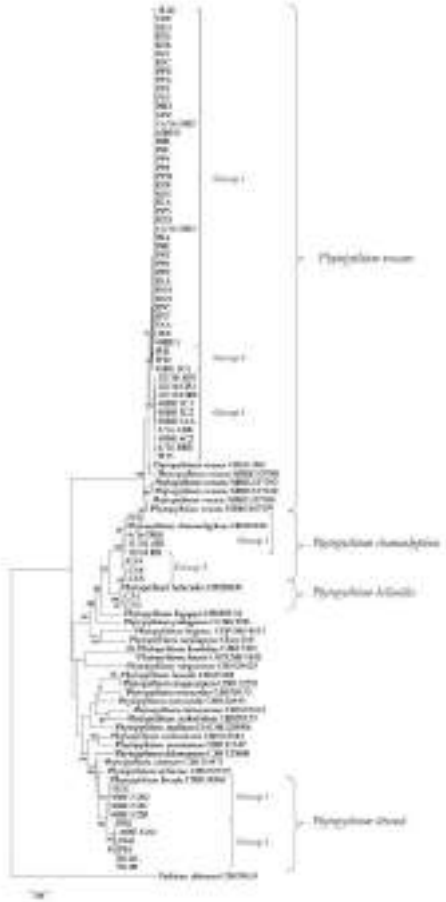
Phytopythium vexans

P. litorale

P. chamaehyphon

P. helicoides

- 71 ceppi di *Phytopythium* spp. isolati dal 2016 al 2019
- Riproduzione dei sintomi
- Per tutte le specie, alta variabilità intraspecifica

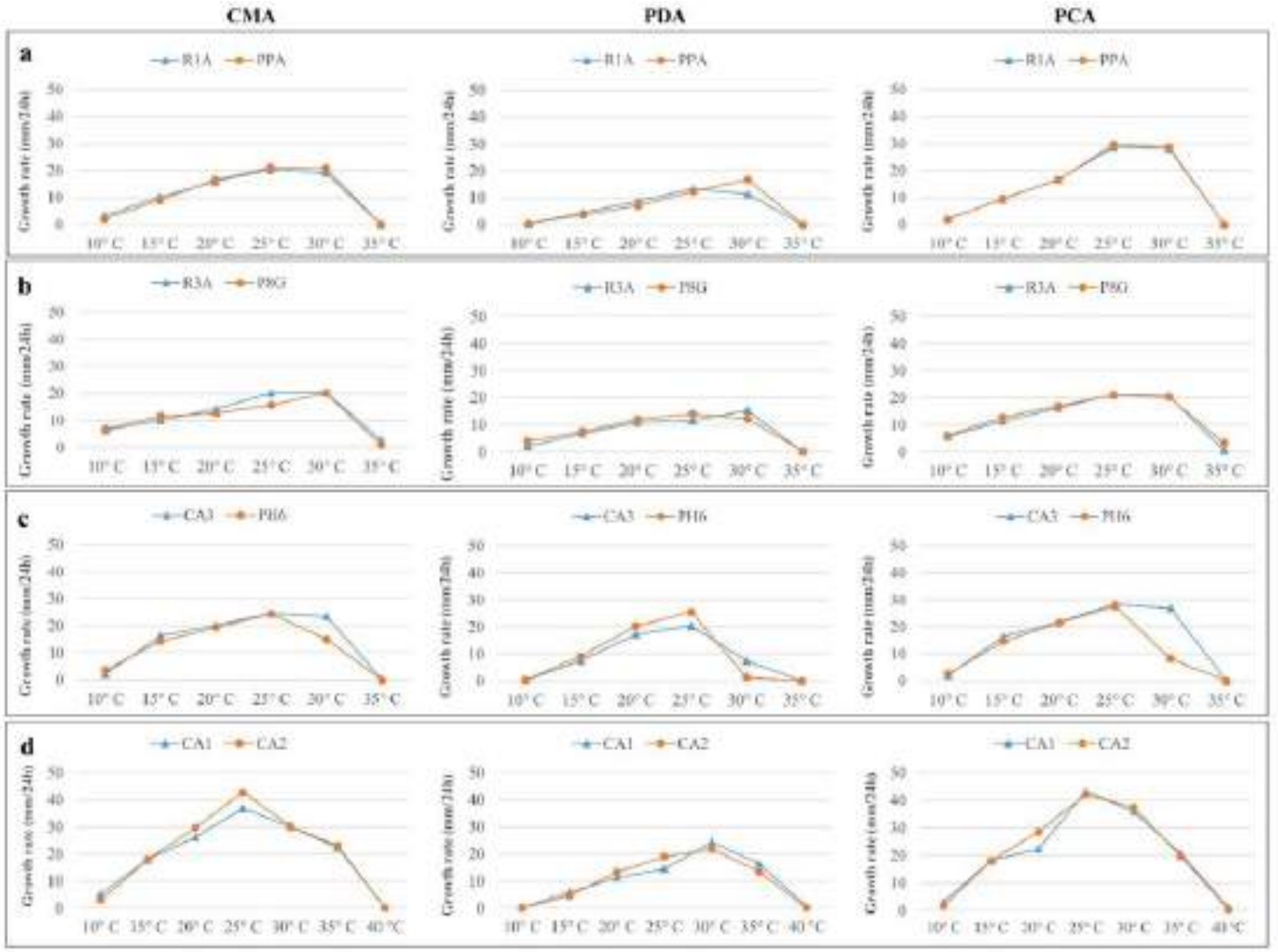


Analisi filogenetica multilocus
Maximum Likelihood (ITS, LSU e COI)

Oomiceti associati alla moria in Piemonte

- **Temperature ottimali di crescita >25°C**. Potrebbero essere favoriti dall'aumento medio delle temperature del suolo.

- **Il ristagno idrico potrebbe avere un doppio effetto**: stressare la pianta con un'ipossia temporanea e favorire il rilascio di zoospore infettive da parte degli oomiceti.



Tasso di crescita (mm/24h) di *Phytopythium* su CMA, PDA and PCA dopo 5 giorni a diverse temperature

(a) P. vexans, (b) P. litorale, (c) P. chamaehyphon, (d) P. helicoides

STEP 2 - Campionamento di radici, rizosfera e suolo

Campionamento di suolo e radici di actinidieti sani e colpiti da moria (anno 2021)

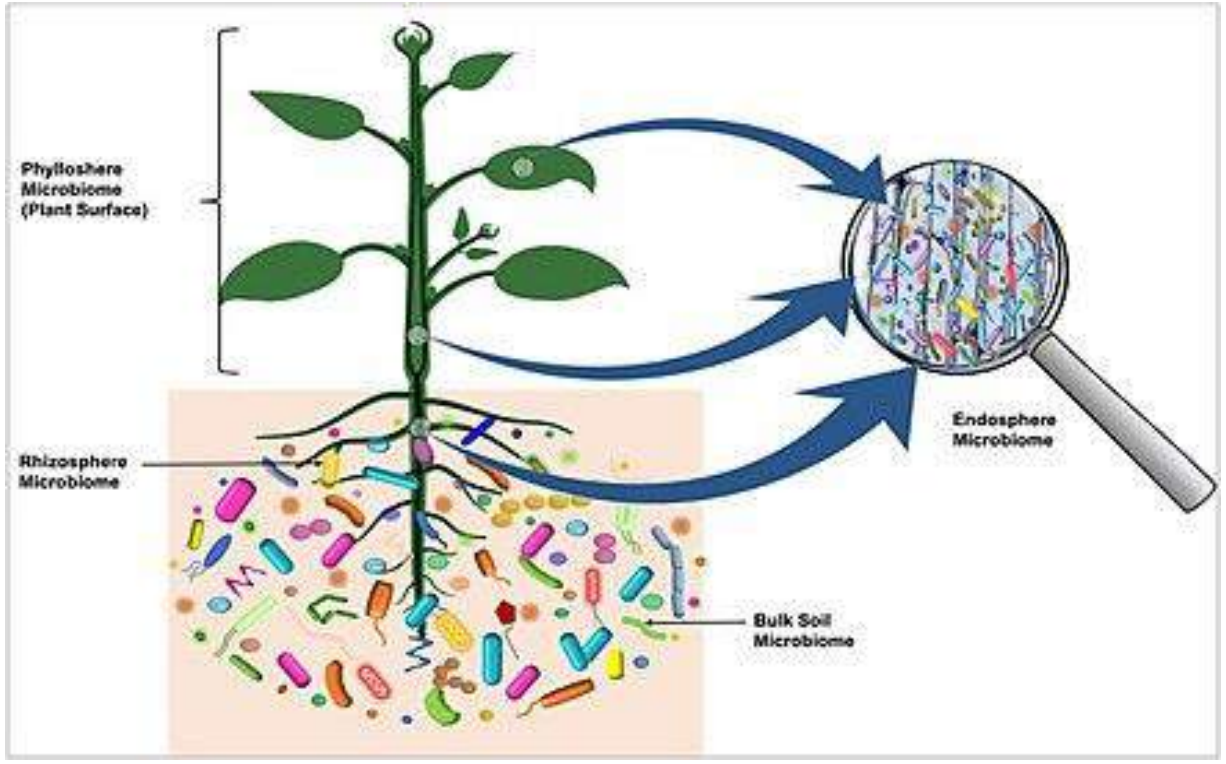
→ **Conservazione** dei campioni a -80° per preservare il DNA

→ **Separazione** della rizosfera dalle radici ed **estrazione di DNA** da tutte le matrici

→ Caratterizzazione del microbioma delle **radici**

→ Caratterizzazione del microbioma della **rizosfera**

→ Caratterizzazione del microbioma del **suolo**



Soil, rhizosphere, and root microbiome in kiwifruit vine decline, an emerging multifactorial disease

Micol Guaschino[1,2], Marco Garello[1,2], Luca Nari[3], Yeka V. Zhimo[4], Samir Droby[4] and Davide Spadaro[1,2]*

frontiers | Frontiers in Microbiology

Campionamento di 8 campi in 4 comuni



4 comuni
2 situazioni fitosanitarie: sano e colpito
3 matrici: suolo, rizosfera e radici
5 replicazioni
Analisi di batteri, funghi ed oomiceti

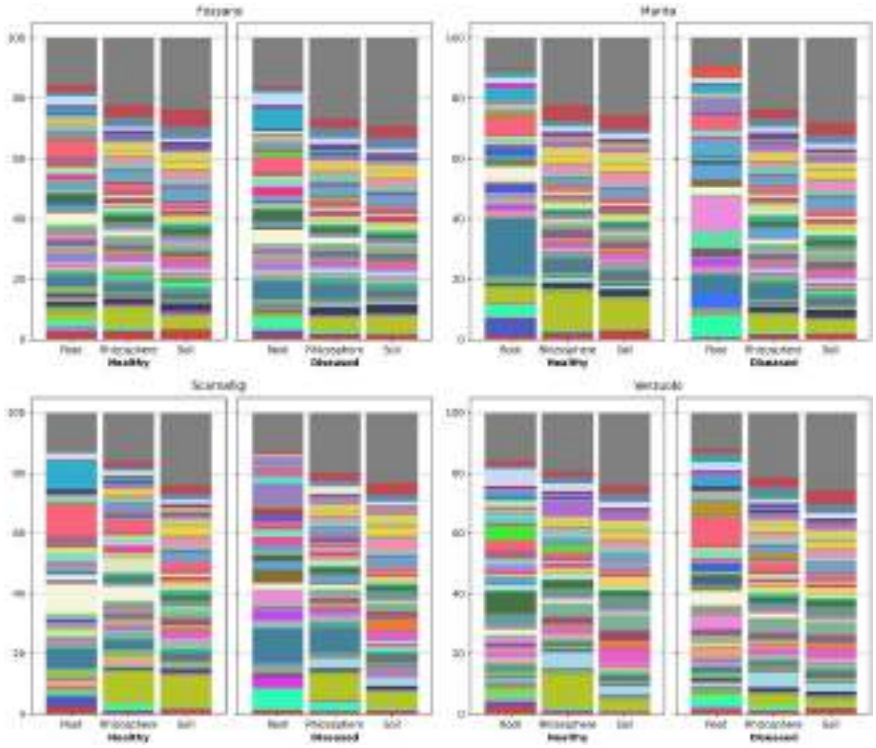
4 x 2 x 3 x 5 x 3 = 360 campioni

Caratteristiche chimico-fisiche dei suoli

	SANO					COLPITO				
Identificativo frazione	Manta	Scarnafigi	Fossano	Verzuolo	media	Manta	Scarnafigi	Fossano	Verzuolo	media
prelievo	I	I	I	I		I	I	I	I	
Argilla (%)	8,18	8,85	7,28	6,13	7,86	10,75	8,85	8,77	6,07	8,87
Limo totale (%)	48,10	42,40	33,08	26,58	37,53	49,02	45,15	31,90	26,08	40,75
Sabbia totale (%)	43,72	48,08	59,65	69,33	54,91	40,30	45,90	59,27	68,18	50,38
pH [misura]	6,24	7,41	6,80	7,95	6,95	6,71	7,23	6,85	7,96	7,07
Calcare totale (%)	0,38	0,59	0,70	0,76	0,64	0,38	0,39	0,50	0,09	0,44
Sostanza org. (%) calcolata	2,847	2,366	0,903	0,514	2,66	1,349	1,661	4,170	2,498	2,17
Carbonio org. (%)	1,180	1,371	2,211	1,482	1,66	0,837	1,070	2,424	1,451	1,44
Azoto totale (%)	0,1551	0,1740	0,2430	0,1556	0,18	0,1008	0,1482	0,2709	0,1575	0,17
Rapporto C/N	7,7	7,9	9,1	9,4	8,51	8,3	7,2	8,7	9,2	8,38
CSC [meq/100g]	15,1	11,3	14,0	10,2	12,89	11,8	11,9	14,6	12,2	12,81
Calcio scamb. (ppm)	1703	1640	1701	1051	1677,34	1486	1570	1939	1904	1719,84
Calcio scamb. [meq/100g] calcolati	8,53	8,23	8,69	5,24	8,67	7,44	7,83	9,63	9,50	8,84
Calcio scamb. su CSC (%)	56,8	72,8	62,4	51,5	62,71	63,0	65,8	65,6	78,1	68,13
Magnesio scamb. (ppm)	157	103	144	101	141,48	159	174	199	118	166,62
Magnesio scamb. [meq/100g] calcolati	1,29	1,34	1,19	0,85	1,16	1,31	1,43	1,64	0,97	1,32
Magnesio scamb. su CSC (%)	8,6	11,8	8,5	8,2	9,27	11,1	12,0	10,8	8,0	10,47
Potassio scamb. (ppm)	76	474	407	89	268,91	86	71	462	91	176,18
Potassio scamb. [meq/100g]	0,196	1,212	1,117	0,227	0,69	0,220	0,181	1,202	0,102	0,46
Potassio scamb. su CSC (%)	0,013	0,107	0,080	0,022	0,06	0,022	0,015	0,083	0,013	0,03
Rapporto Ca/Mg	6,6	6,1	7,1	8,8	7,45	6,7	6,5	6,8	8,8	6,78
Rapporto Ca/K	43,7	6,6	7,8	36,3	23,89	29,4	43,4	7,7	60,7	35,29
Rapporto Mg/K	6,6	1,1	1,1	3,7	3,11	5,1	7,0	1,3	8,2	5,13
Saturaz. basica	66,4	85,4	76,0	91,5	82,33	78,7	78,0	84,7	87,3	81,95
Fosforo assim. (ppm)	17,2	85,8	179,4	107,6	98,25	43,7	21,7	198,4	41,6	73,29
Anidride fosforica assim. (ppm)	39,2	216,8	410,8	120,0	197,68	100,0	49,8	428,8	95,1	167,84
Ferro assim. (ppm)	150	75	132	46	100,51	86	51	147	56	84,82
Manganese assim. (ppm)	12,8	7,0	8,7	4,4	7,71	15,2	13,8	9,5	10,9	12,87
Zinco assim. (ppm)	2,5	2,3	14,8	6,8	6,50	3,8	1,8	15,2	6,8	7,51
Rame assim. (ppm)	4,7	2,2	13,0	13,6	8,49	5,7	4,9	11,7	25,5	11,81
P solubile (ppm)	0,2340	0,2080	0,4710	0,2050	0,32	0,2210	0,2480	0,4720	0,2080	0,31

Studio del microbioma associato a moria del kiwi

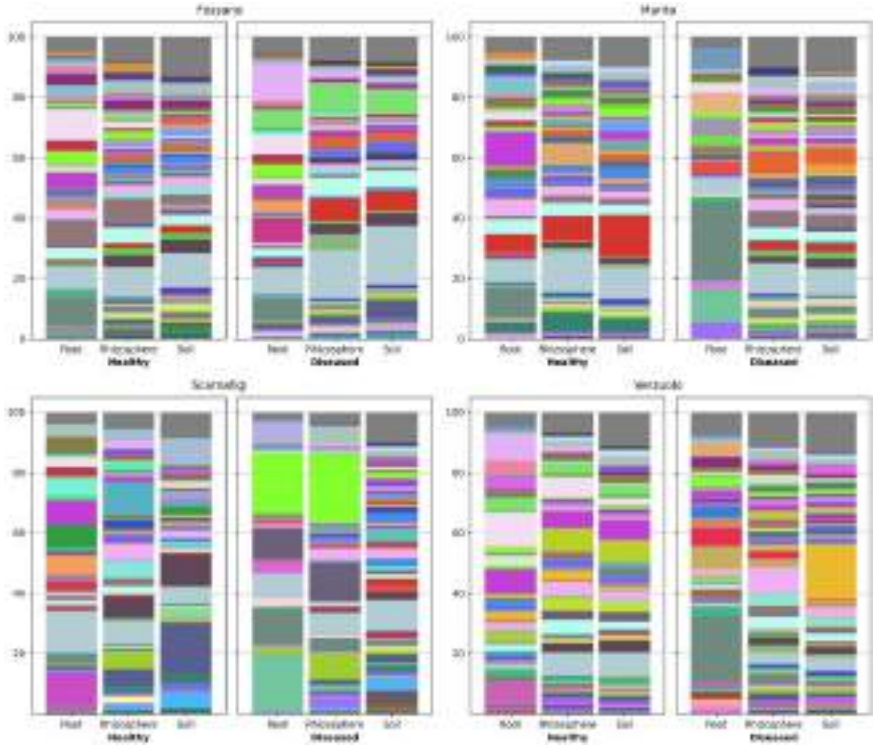
Diversità batterica



In suolo e rizosfera c'è prevalenza del genere ***Bacillus.***

I batteri sono più o meno abbondanti a seconda della matrice e del campo (NON dipendono dallo stato di salute)

Diversità fungina

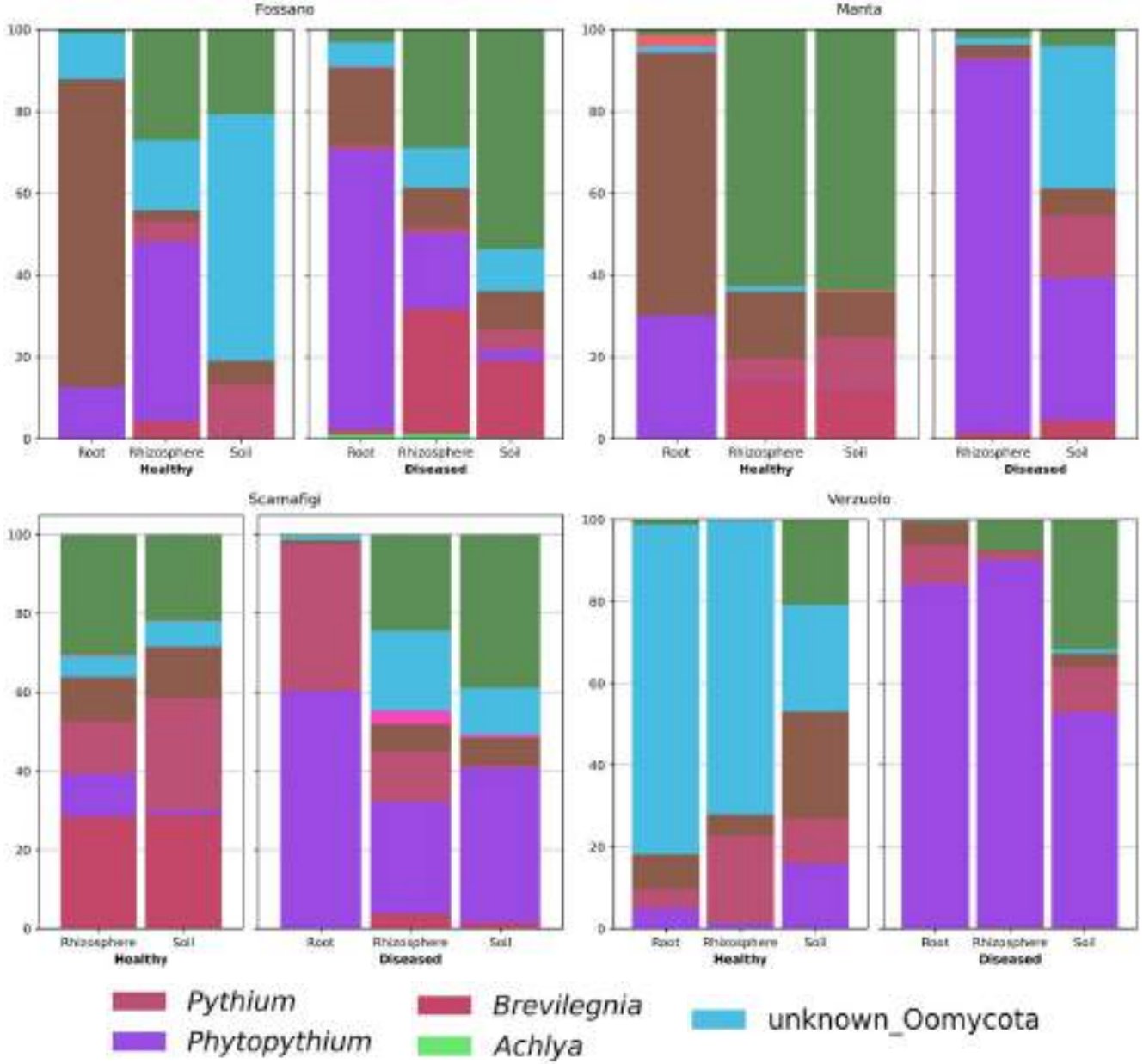


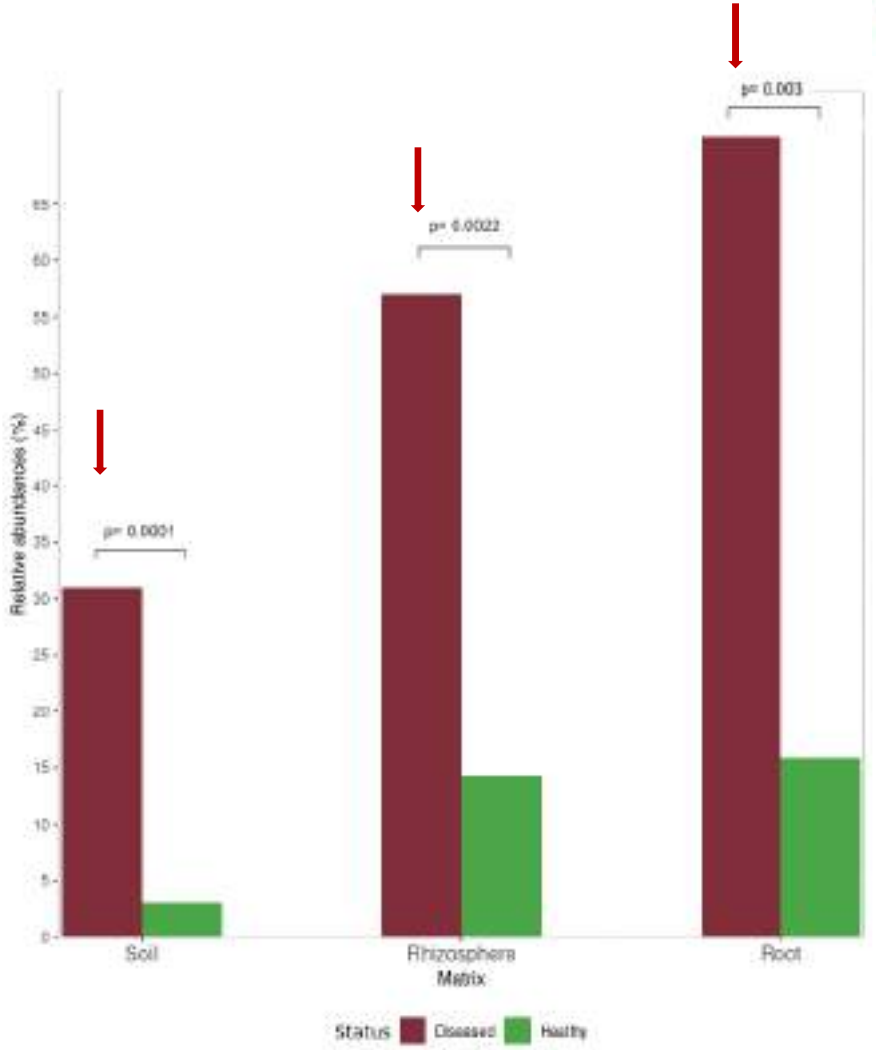
Fusarium è il genere più presente nella rizosfera.

Linnemania and ***Dactylonectria*** sono presenti nei campioni di rizosfera malati.
Dactylonectria **è abbondante in radici malate.**

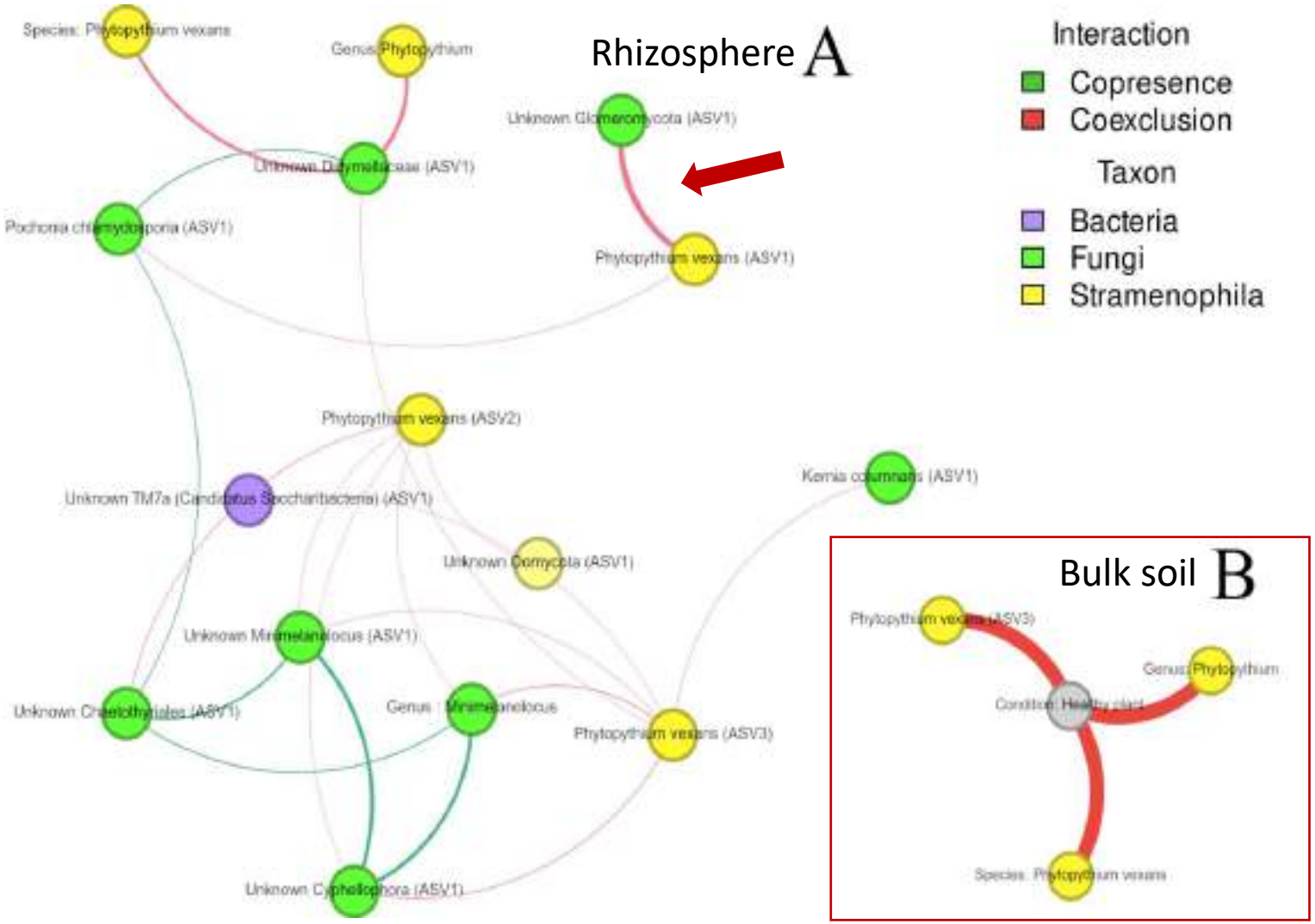
La diversità fungina è specifica per il campo, ma è anche influenzata dallo stato di salute del campo.

In tutte le matrici: elevata presenza di *Phytopythium* spp. in campi colpiti





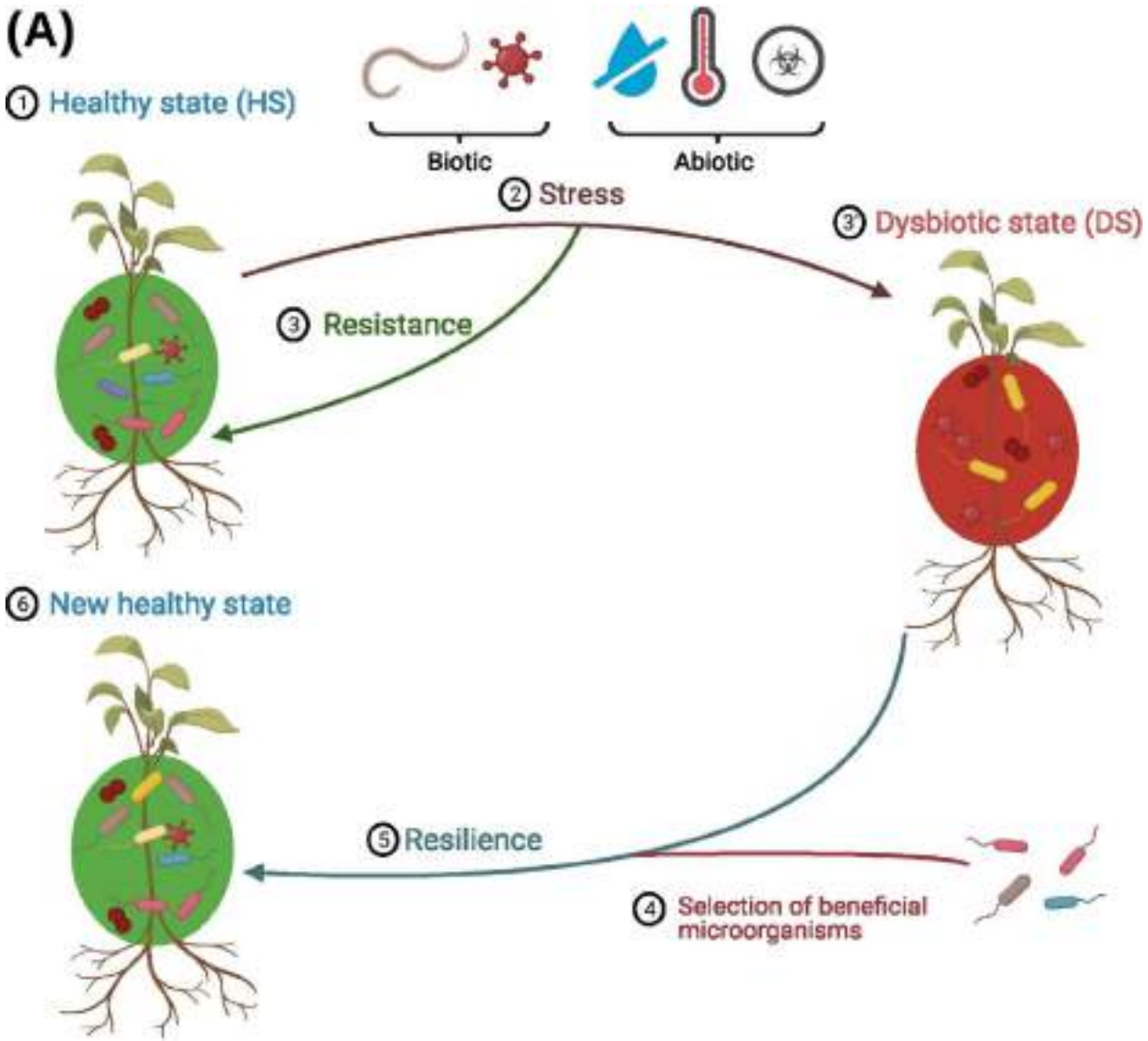
Guaschino, M., Garello, M., Nari, L., Zhimo, Y. V., Droby, S., & Spadaro, D. (2024). *Soil, rhizosphere, and root microbiome in kiwifruit vine decline, an emerging multifactorial disease*. Frontiers in Microbiology, 15, 1330865. https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1330865



Reti di associazione nella rizosfera: mutua esclusione tra le ASV di *Phytopythium* e **i funghi promotori della crescita e micorrizici arbuscolari (AM).**

Le reti di associazione con le proprietà del suolo (*dati non mostrati*) non hanno evidenziato alcuna interazione diretta con le ASV di *Phytopythium*.

Dinamiche di assemblaggio della comunità della rizosfera nella moria



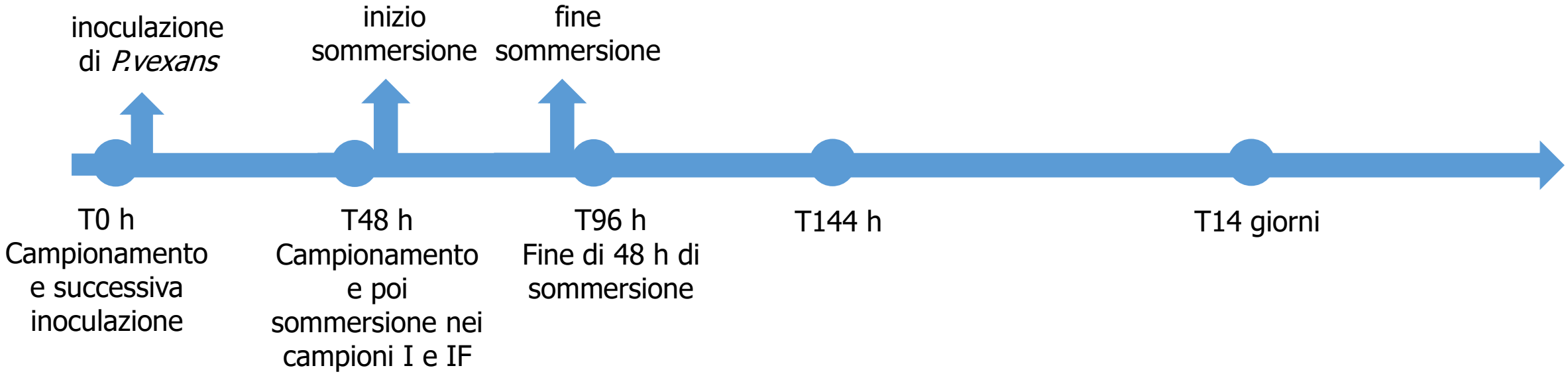
- **Funghi:** assemblaggio quasi completamente stocastico, senza risposta specifica alla malattia
- **Batteri**: aumento relativo della stocasticità nelle comunità malate (principio di Anna Karenina)
- **Oomiceti:** forte aumento della selezione omogeneizzante nelle comunità malate (principio Anti-Anna Karenina)

La moria potrebbe essere considerata una **disbiosi multiregno**: la perdita di controllo della componente batterica convive con la selezione deterministica di una comunità di oomiceti potenzialmente patogena.

Arnault et al., 2023

STEP 3 - Trascrittoma sulle risposte di *Actinidia* alla moria

- 40 piante di *Actinidia deliciosa* 'Hayward'
- 4 gruppi di 10 piante, uno per ciascun trattamento (NS: controllo; I: inoculazione; F: allagamento; IF: stress multifattoriale)
- 3 replicazioni biologiche per ciascun campione: ogni replicazione è costituita da un pool di radici prelevate dagli stessi 3 individui durante l'intero esperimento
- 5 tempi di campionamento



Geni differenzialmente espressi in kiwi

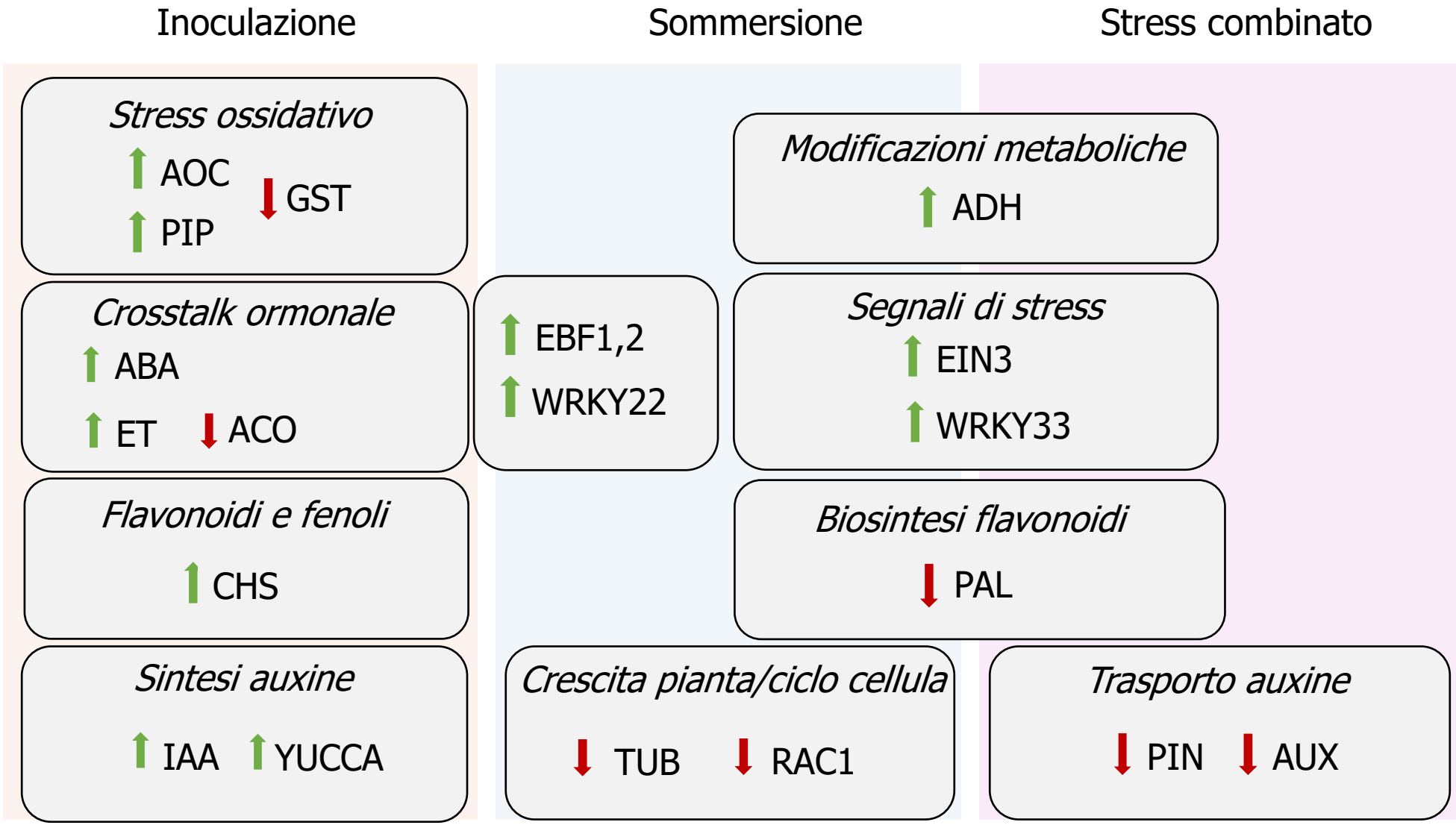
Kiwi DE genes with BH correction based on **LFC > 0** and **p < 0.05**

Inoculato	0	48 h	96 h	144 h	14 d
UP	115	19	43	5	20
DOWN	12	15	461	13	46
Sommerso			96 h	144 h	14 d
UP	-		6844	26	57
DOWN			10397	45	340
Combinazione			96 h	144 h	14 d
UP	-		7961	253	167
DOWN			10813	532	285

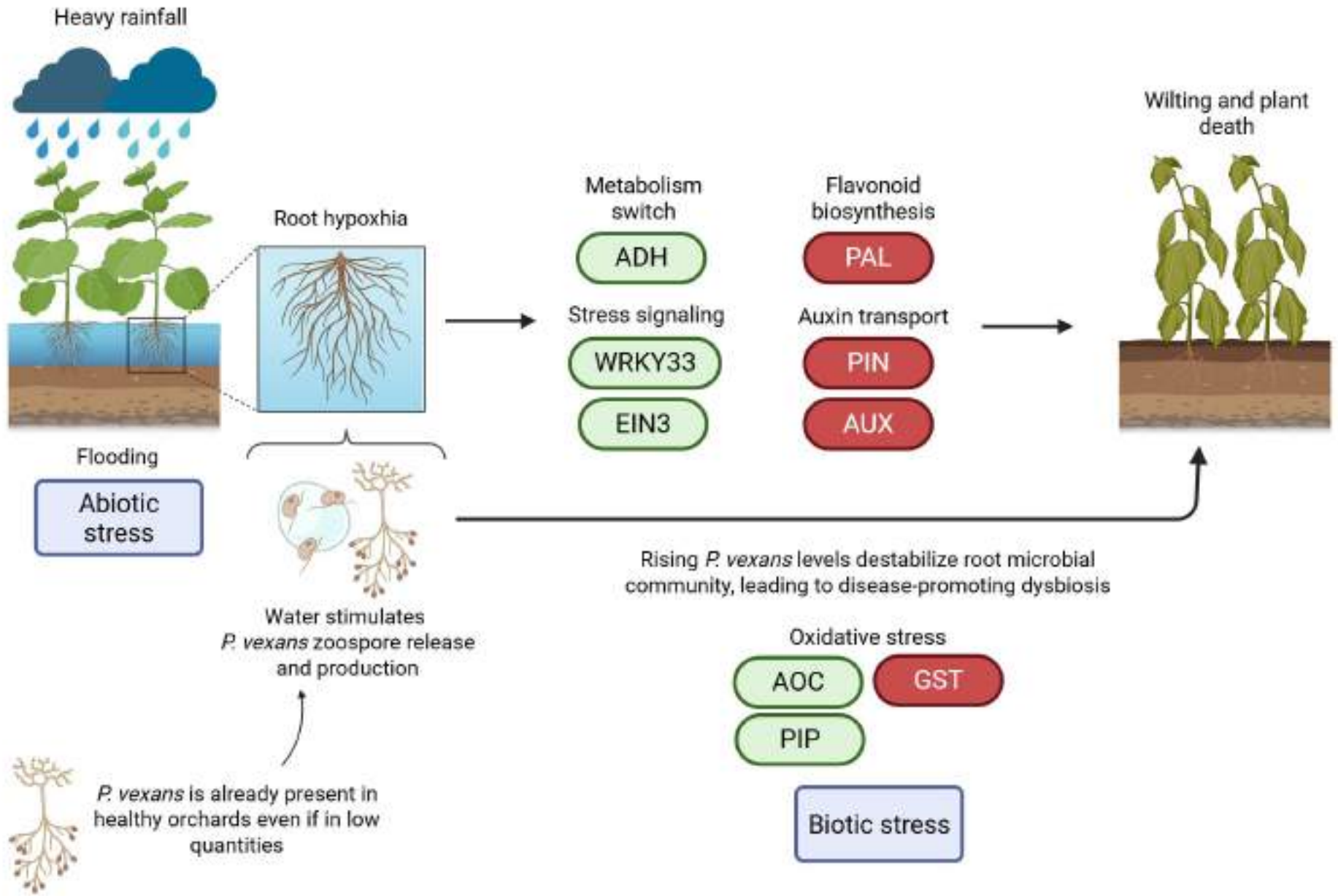


- La maggior parte dei geni è differenzialmente espressa a **96 h** dall'inoculazione (fine della sommersione)
- La **downregolazione** è parte della risposta di adattamento della pianta, indipendentemente dallo stress applicato
- Il numero più alto di geni differenzialmente espressi si osserva con la **combinazione** di stress biotico e abiotico

Confronto diretto della regolazione differenziale dei geni in condizioni di stress

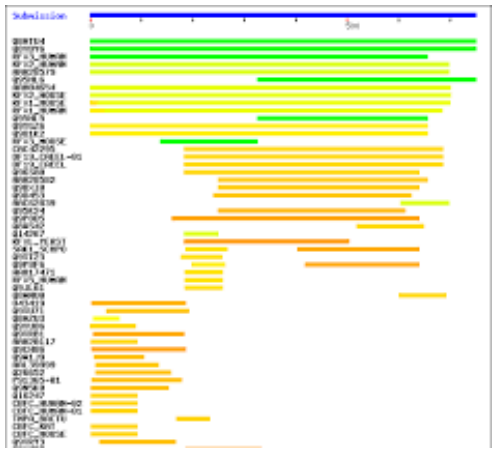


La moria deriva da una **prioritizzazione delle risposte agli stress**:
l'ipossia favorisce l'infezione che, in un contesto di disbiosi del microbioma, sopraffà le difese dell'ospite



STEP 4 - Sviluppo di un saggio diagnostico rapido

Allineamento delle sequenze depositate di specie di *Phytopythium* spp.

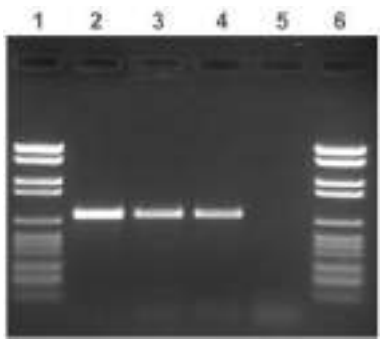


Disegno di primer specifici per l'amplificazione della specie di interesse

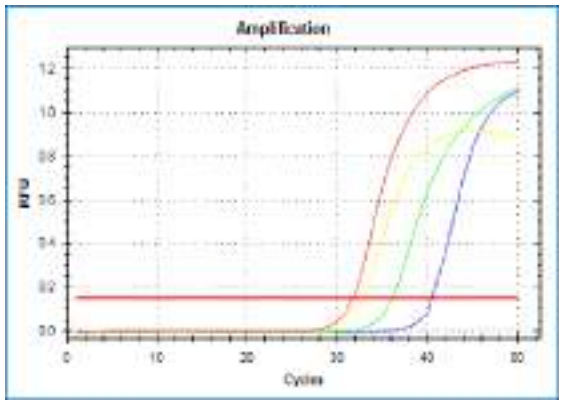
Primer3Plus
pick primers from a DNA sequence

Saggi di validazione per i primer specifici: in silico e wet lab

Nucleotide BLAST
nucleotide ▸ nucleotide



Sviluppo ed ottimizzazione del protocollo di rilevamento



Sviluppo di un saggio diagnostico rapido

	Studi già pubblicati			Guaschino et al., 2025
	Bent et al., 2009	Spies et al., 2011	Moein et al., 2019	
Selettività Validazione su *Actinidia*	Radici di pesco	Radici di vite	Radici di melo, acqua	Radici di kiwi, suolo
Specificità Marker affidabile e specie-specifico	ss rRNA	*Inositol polyphosphate 5 phosphatase*	*Inositol polyphosphate 5 phosphatase*	*COI*
Considerando diversi gruppi filogenetici	no	✓ si	✓ si	✓ si
Inclusione di specie off-target	no	no	no	✓ si
Sensibilità (LOD)	-	27.2 fg in un gruppo	2000 fg	20 fg per tutti i gruppi

Guaschino, M., Prencipe, S., Somera, T., Tabone, G., & Spadaro, D. (2025). Development of a qPCR assay for early detection and quantification of *Phytopythium vexans* in kiwifruit plant and soil affected by Vine Decline Syndrome. *Plant Disease*, (in press). https://doi.org/10.1094/PDIS-09-24-2044-RE

Saggio diagnostico su materiale di campo

- Campionamento in actinidieto sperimentale con alta incidenza di moria
- Radici e suolo rizosferico campionati da 10 individui (3 asintomatici e 7 sintomatici)
- Estrazione di DNA da radice e da suolo per quantificazione di *Phytopythium vexans*



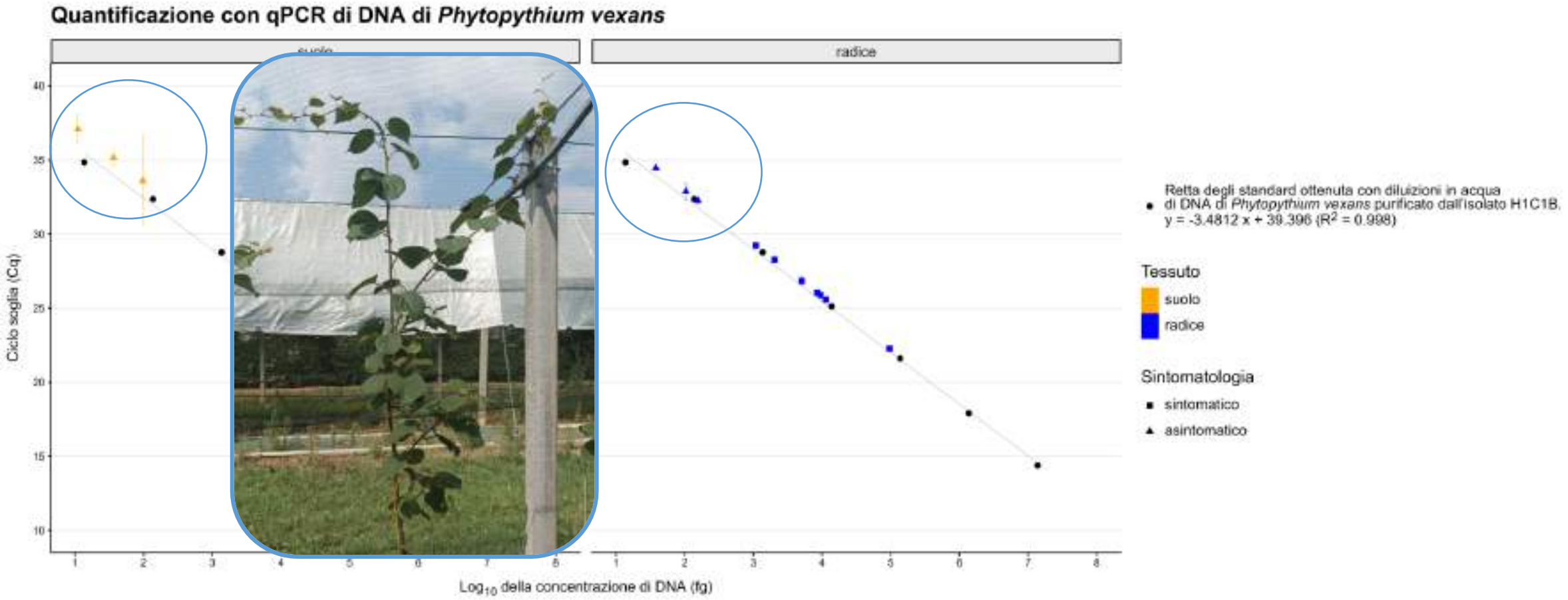


Esempi di sintomatologie osservate

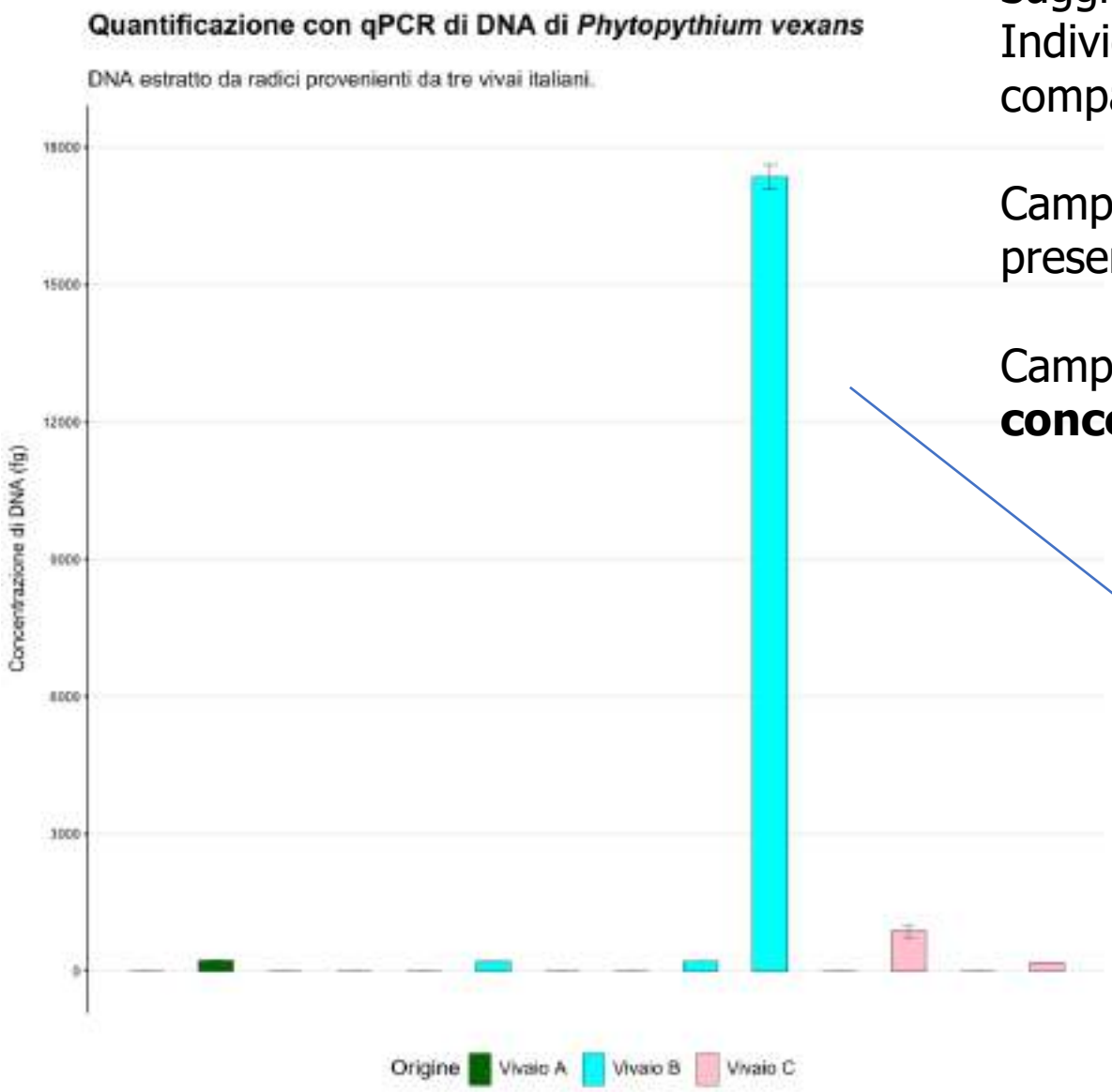
Saggio diagnostico su materiale di campo

Sia per quanto riguarda il suolo sia per quanto riguarda la radice, la **quantificazione di *P. vexans* è correlata alla gravità dei sintomi visibili**:

- i 3 campioni asintomatici hanno quantificazioni quasi sotto la soglia di rilevamento del saggio;
- nei campioni sintomatici si ritrovano alte concentrazioni di DNA del patogeno.



Diagnostica precoce in vivaio



Saggio diagnostico su materiale propagativo in vivaio. Individuazione della presenza del patogeno prima della comparsa dei sintomi con saggio non distruttivo.

Campione con la **più alta concentrazione di *P. vexans*** presentava **forte sintomatologia a livello radicale**.

Campioni, in cui si è individuata una **bassa concentrazione, non presentavano sintomi.**



Take home message

- Isolamento di *Phytopythium* spp. da radici infette a partire dal 2016. Tra gli isolati, prevalenza di *P. vexans*
- Riproduzione dei sintomi della moria in condizioni di ristagno idrico e in seguito all'inoculazione con *Phytopythium* spp.
- Oomiceti favoriti dal **ristagno idrico** e dall'aumento della **temperatura del suolo**

- Analisi del microbioma di suolo, rizosfera e radici

Disbiosi multiregno: perdita di controllo della componente batterica e selezione deterministica degli oomiceti

- La moria deriva da una concatenazione di fattori di stress: l'ipossia favorisce la disbiosi, nel microbioma alterato è favorita l'infezione da parte di *Phytopythium* spp. che supera le difese dell'ospite indebolito

- Metodo molecolare basato sulla qPCR per il rilevamento di *P. vexans*, utile per la diagnosi precoce in vivaio

Ringraziamenti

Ilaria Martino
Simona Prencipe
Elisabetta Talevi
Marco Garello
Micol Guaschino
Chiara Platania

Paolo Ermacora
Marta Martini

Leonardo Schena
Antonino Malacrinò
Saveria Mosca

Luca Nari

Tracey Somera
Heidi Hargarten
Loren Honaas
Huiting Zhang
Chris Cook