Diagnosi molecolare mediante qPCR per tracciare Phytophthora sojae-*like, un importante oomicete associato alla moria del kiwi*

Davide **Tommasini**, Chiara **Bernardini**, Paolo **Ermacora,** Marta **Martini**
Università di Udine

SOS KIWI

PROGETTO Ager AGROALIMENTARE E RICERCA | FONDAZIONI IN RETE PER LA RICERCA AGROALIMENTARE

SOS KIWI

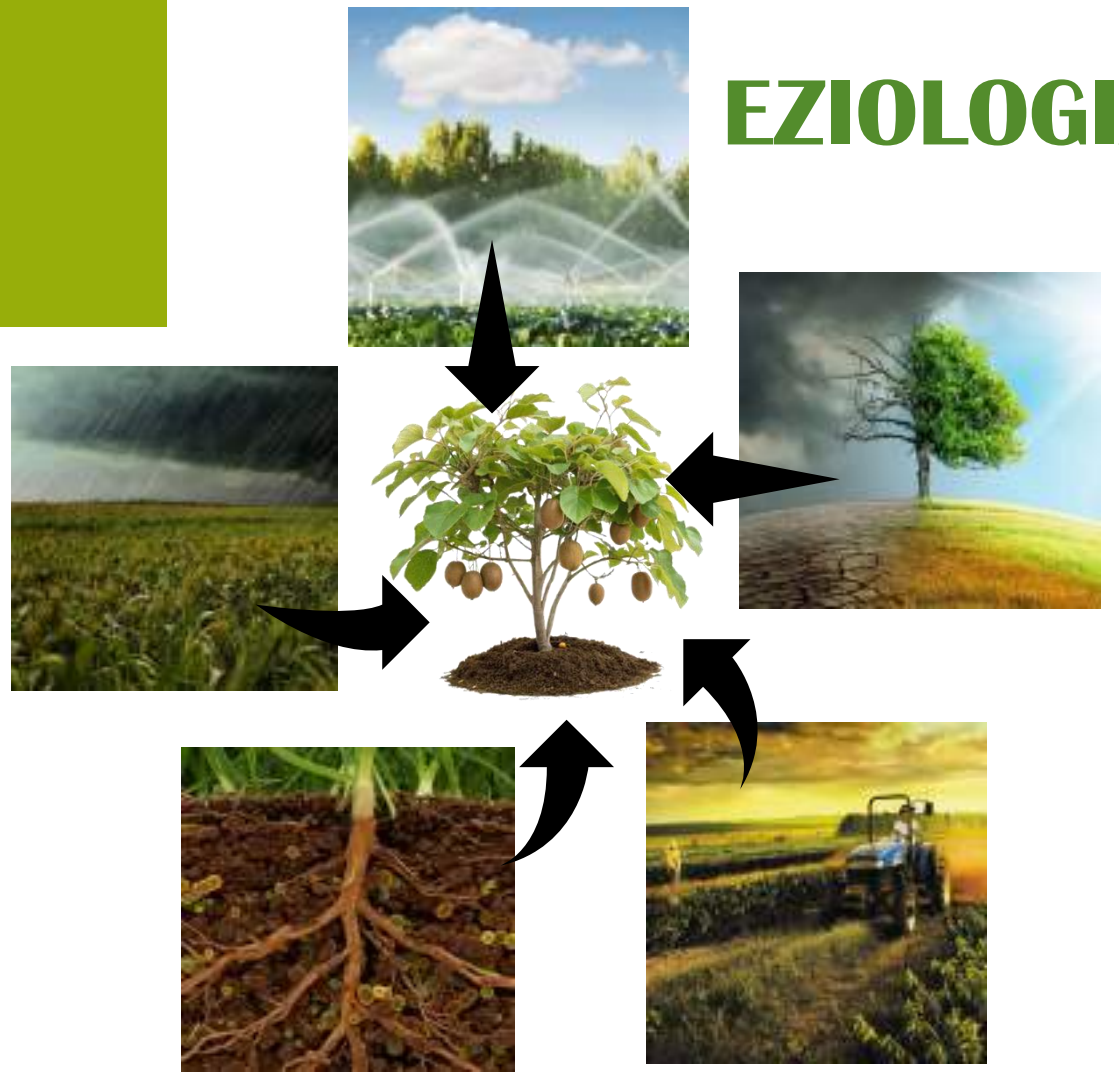
Il parte

MORIA DEL KIWI: sindrome multifattoriale

EZIOLOGIA

FATTORI ABIOTICI

- Carenza di ossigeno nel suolo
  - gestione agronomica
  - gestione idrica
  - compattamento
  - granulometria
  - condizioni climatiche



FATTORI BIOTICI

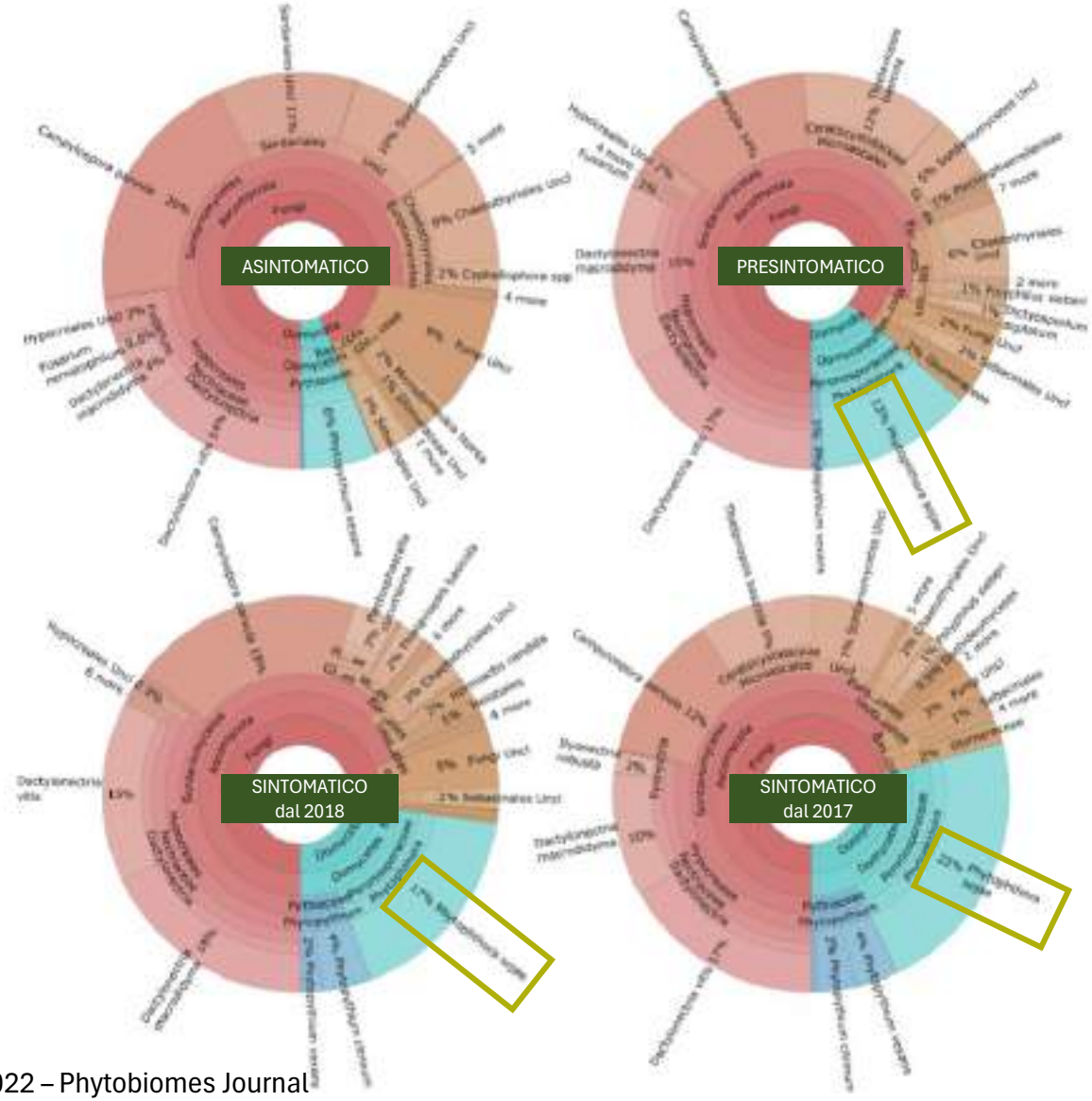
- Batteri (*Clostridium*, *Ralstonia*)
- Funghi (*Fusarium*, *Dactylonectria*, *Ilyonectria*, *Desarmillaria*, *Thielaviopsis*, *Thelonectria*)
- Oomiceti (*Pythium*, *Globisporangium*, ***Phytopythium***, ***Phytophthora***)

SOS KIWI

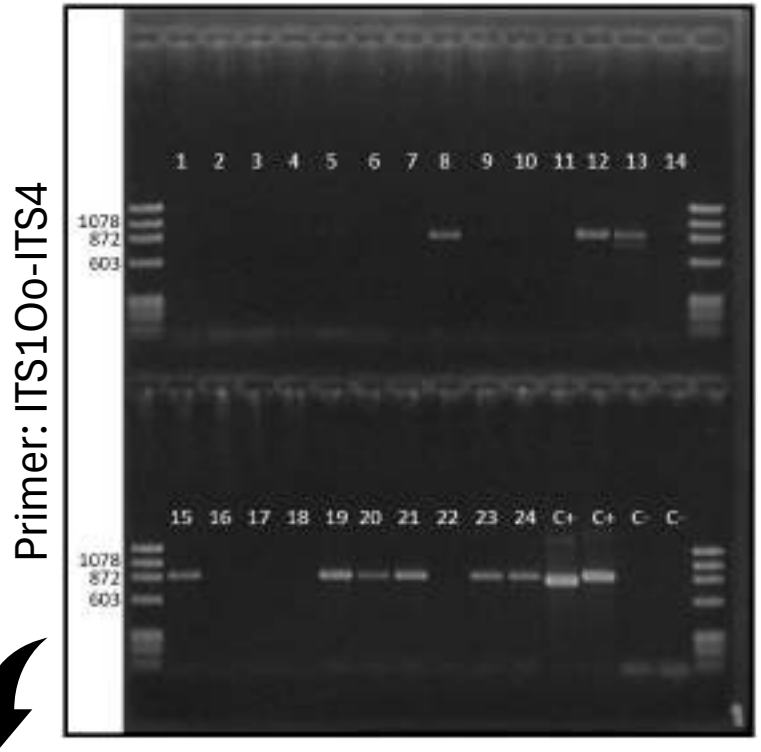
Il parte

MORIA DEL KIWI

Phytophthora sojae - like



Savian et al., 2022 – Phytobiomes Journal



Purificazione e sequenziamento Sanger
→ omologia del 99,07% con *P. sojae* (sottoclade 7b)
→ nome provvisorio: *P. sojae*-like

Al momento *P. sojae*-like non è stata isolata:

- Non si può caratterizzare morfologicamente
- Non si può provare la sua patogenicità

SOS KIWI

Il parte

OBIETTIVO 1

Conoscere meglio *P. sojae* – like: che organismo abbiamo trovato?

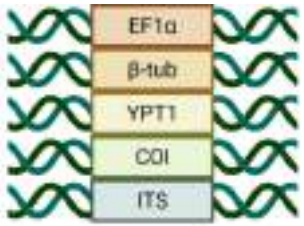
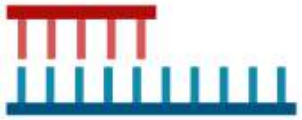
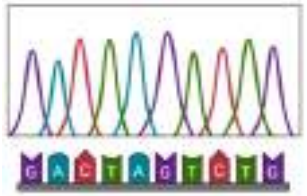
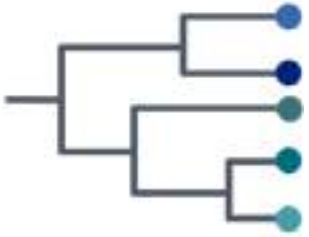
CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE MULTILOCUS

Analisi filogenetica sulle sequenze concatenate di 5 geni target (ITS, *COI*, *YPT1*, *β-TUB*, *EF1α*)

SOS KIWI

Il parte

CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE MULTILOCUS *Workflow*

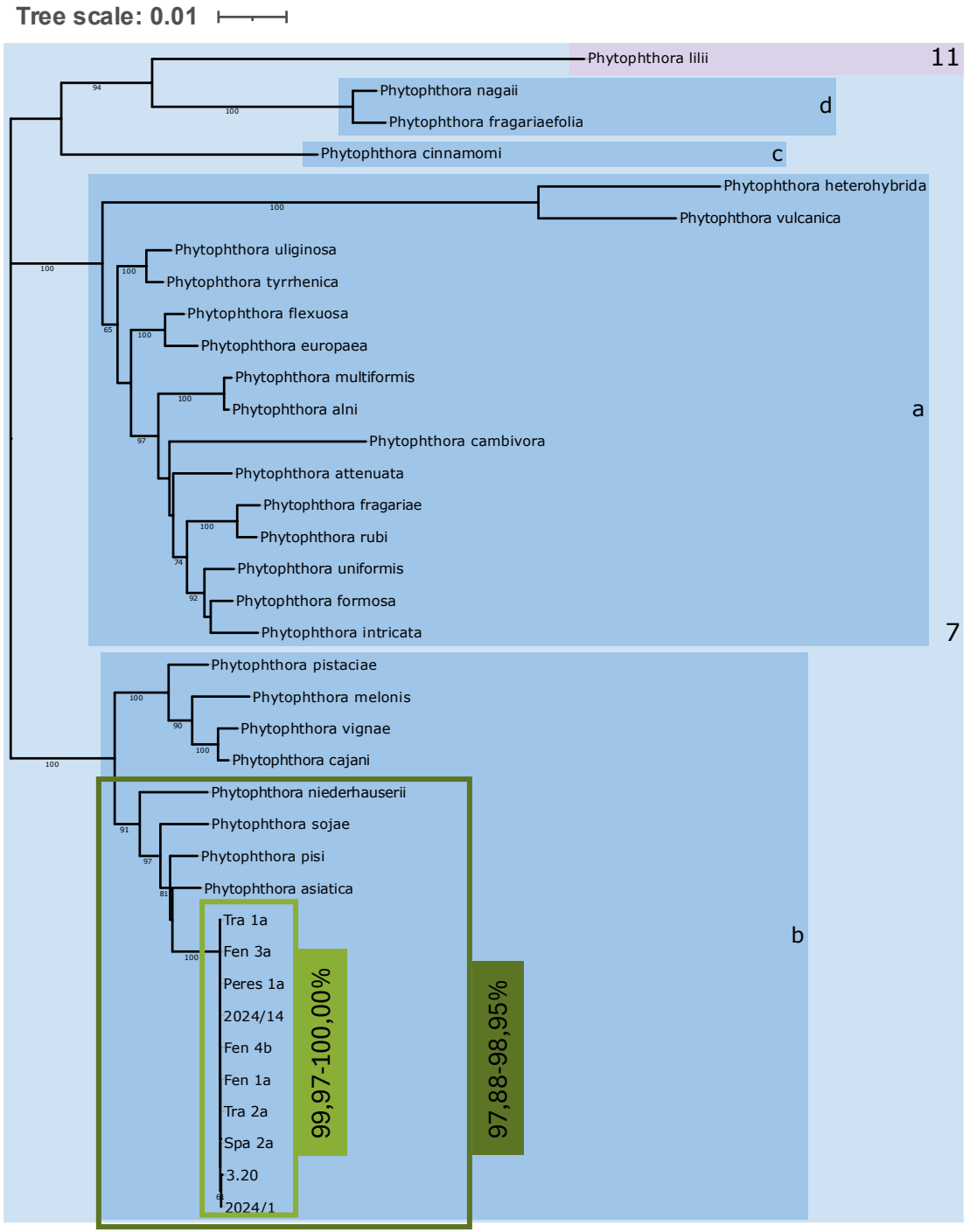
1	2	3	4	5
				
Scelta geni target: ITS, *COI*, *YPT1*, *β-TUB*, *EF1α*	Disegno primer specifici per sottoclade 7b	Amplificazione PCR da DNA genomico estratto da radice (*P. sojae*-like rilevata con metabarcoding)	Purificazione e Sequenziamento Sanger	Matrici di similarità ed analisi filogenetica

SOS KIWI

Il parte

CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE MULTILOCUS

- **Analisi di sequenza**:
  - Sequenze dei ceppi identiche fra loro
  - *YPT1* locus nucleare con maggiore variabilità
- **Analisi filogenetica**:
  - *P. sojae*-like: linea evolutiva distinta dalle specie già note (nuova specie putativa)
  - Confermata appartenenza al sottoclade 7b
  - Gruppo monofiletico con *P. sojae*, *P. pisi*, *P. asiatica*, *P. niederhauserii*



SOS KIWI

Il parte

OBIETTIVO 2

Strumento diagnostico: come possiamo rilevare *P. sojae* – like?

SVILUPPO DI SAGGI SPECIFICI

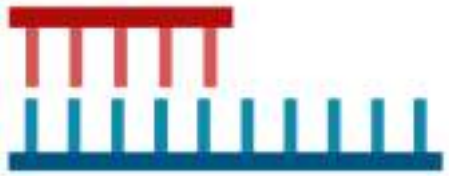
Per la detection e la quantificazione mediante Real-Time PCR

SOS KIWI

Il parte

SVILUPPO SAGGI SPECIFICI *Workflow*

1



DISEGNO PRIMER

Sui target più variabili:

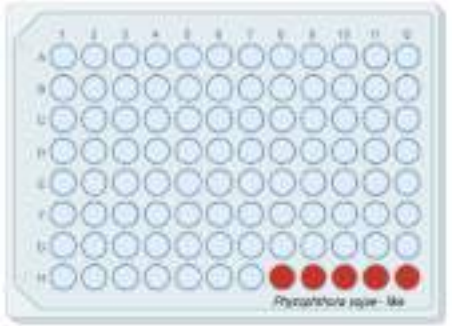
- Regione ITS
- Gene *YPT1*

2a

PROVA DI SPECIFICITÀ

Phytophthora spp.

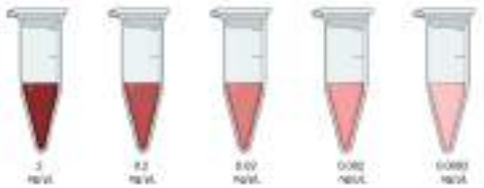
Phytopythium vexans

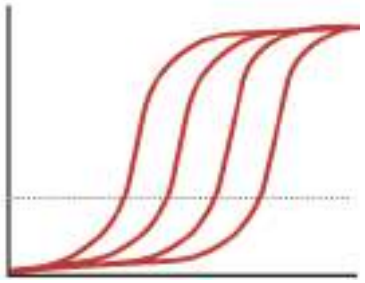


2b

DETERMINAZIONE DELL'EFFICIENZA

Diluizioni seriali di ampliconi ITS e *YPT1*





SOS KIWI

Il parte

PROVA DI SPECIFICITÀ

- Saggio basato sulla regione ITS: specifico per il **sottoclade 7b**
- Saggio basato sul gene *YPT1:* specifico per ***P. sojae*-like**

SPECIE	ITS_Psojae-like F1/R2		soj_YPT_F2/R1	
	Cq	T melt	Cq	T melt
Sottoclade 7b				
P. sojae-like (7 c)	16,62	83	26,12	84,5
P. sojae-like (19 c)	20,93	83	29,39	84,5
P. sojae-like (41 c)	19,25	83	27,67	84,5
P. sojae-like (34 c)	22,03	83	31,18	84,5
P. niederhauserii	25,1	83	-	-
P. melonis	20,29	83	-	-
Sottoclade 7a				
P. alni-multiformis	-	-	-	-
P. alni uniformis	-	-	-	-
P. cambivora (S13)	-	-	-	-
P. cambivora (CB25)	-	-	-	-
P. fragariaexfrag.	34,42	77	-	-
P. fragariaexrubi	-	-	-	-
Sottoclade 7c				
P. cinnamomi (S4)	-	-	-	-
P. cinnamomi (NEW_ID6)	-	-	-	-
P. cinnamomi (KW7)	-	-	-	-
Clade 1	-	-	-	-
Clade 2	-	-	-	-
Clade 3	-	-	-	-
Clade 4	-	-	-	-
Clade 6	-	-	-	-
Clade 8	-	-	-	-
Clade 10	-	-	-	-
Clade 12	-	-	-	-
Phytopythium vexans	-	-	-	-

Si ringraziano il prof. Leonardo Schena e il prof. Benedetto Linaldeddu per gli isolati di *Phytophthora* spp.

SOS KIWI

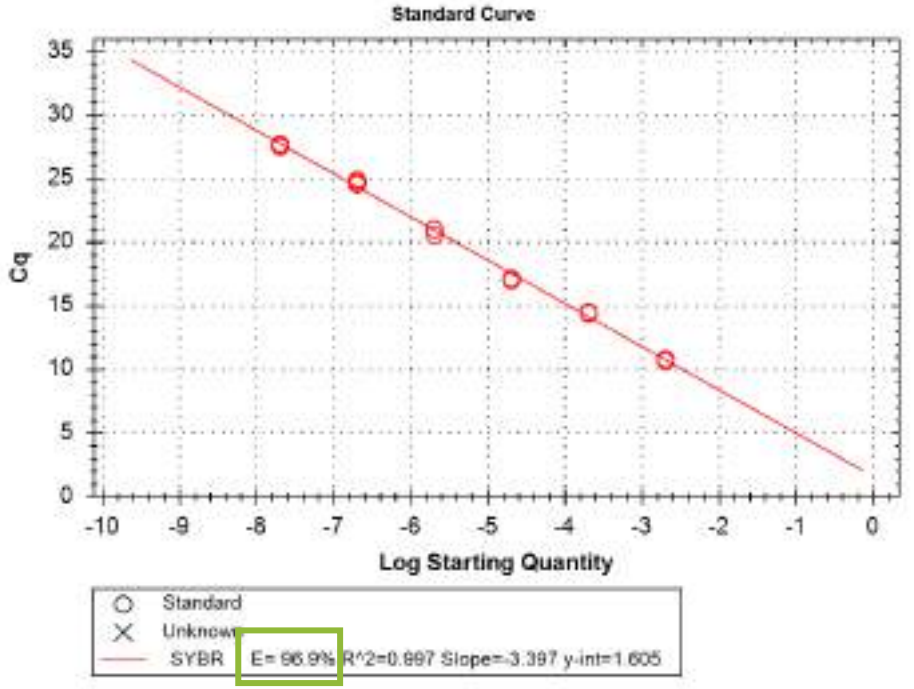
Il parte

DETERMINAZIONE DELL'EFFICIENZA

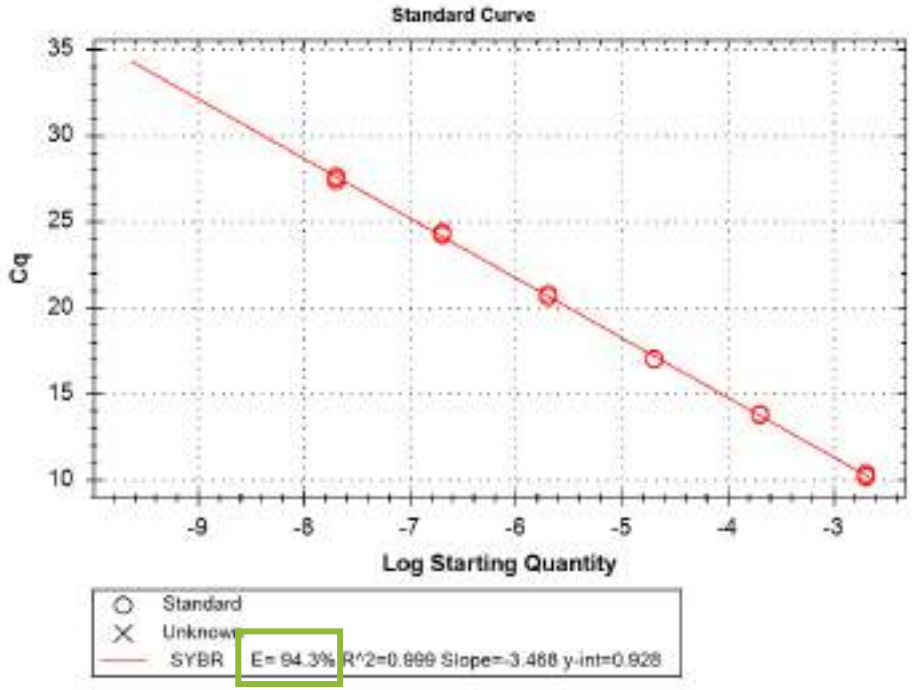
- Entrambe le coppie possono essere usate per la quantificazione mediante Real-Time PCR

- Diversa sensibilità
  - ITS = più copie nel genoma
  - *YPT1* = singola copia

ITS_Psojae_F1/R2



Psoj_YPT_F2/R1



SOS KIWI

Il parte

OBIETTIVO 3

I saggi funzionano sui campioni di radice?
P. sojae –like è associato alla malattia?

APPLICAZIONE DEL SAGGIO A PIANTE DI *Actinidia*

Monitoraggio in campioni prelevati in aziende del FVG nelle annate 2024 e 2025
Detection in aziende del Piemonte e del Lazio (con il contributo di UniTo e CREA)

APPLICAZIONE DEI SAGGI A PIANTE DI *Actinidia* **Workflow**

SOS KIWI

II parte

1



CAMPIONAMENTO

- Regioni diverse (FVG, Piemonte, Lazio)
- Aziende diverse
- Annate diverse
- Diversa gravità dei sintomi

2



PULITURA RADICI

- Separazione rizosfera ed endosfera:
  - Epiphyte Removal Buffer
  - Sonicazione

3



ESTRAZIONE DNA GENOMICO

- Da endosfera
- 4% CTAB

4



RealTime-PCR

- ITS_Psojae_F1/R2
- Psoj_YPT_F2/R1

SOS KIWI

II parte

DETECTION DI *P. sojae*-like

- Congruenza dei risultati ottenuti con le due coppie di primer

- Saggio ITS più sensibile:
  - ITS: 66.2% positivi |range Cq: 17,6 – 28,4
  - *YPT1*: 47.7% positivi |range Cq: 26,2 – 33,8

FVG 2025

Azienda	Campione	Stato	ITS_P.sojae-like_F1/R2		P.soj_YPT1_F2 /R1	
			Cq	T melt	Cq	T melt
QUI	1	asintomatico	-	-	-	-
QUI	2	asintomatico	-	-	-	-
QUI	3	asintomatico	-	-	-	-
QUI	4	asintomatico	-	-	-	-
QUI	5	asintomatico	-	-	-	-
SPA	6	sintomi medi	18,7	82,8	26,92	84,4
SPA	7	sintomi medi	17,6	82,8	26,4	84,4
SPA	8	sintomi medi	18,12	82,6	26,66	84,4
SPA	9	sintomi medi	23,15	83,2	32,23	84,2
SPA	10	sintomi gravi	19,02	82,8	27,99	84,4
SPILI	11	sintomi medi	18,47	82,8	27,17	84,4
SPILI	12	sintomi gravi	19,78	82,8	28,6	84,2
SPILI	13	sintomi medi	19,47	82,8	28,38	84,4
YUR25	14	sintomi lievi	17,71	82,8	26,23	84,4
YUR25	15	sintomi lievi	22,25	82,8	31,38	84,2
YUR25	16	sintomi lievi	19,53	82,8	28,37	84,4
YUR25	17	sintomi lievi	20,47	82,8	28,23	84,4
YUR25	18	sintomi lievi	21,34	82,8	29,45	84,4
YUR25	19	sintomi lievi	20,8	83,2	30,47	84,2
YUR25	20	sintomi lievi	22,37	82,8	30,89	84,4
YUR25	21	sintomi lievi	21,89	82,8	30,76	84,4
YUR25	22	sintomi lievi	22,73	82,8	31,33	84,2
YUR25	23	presintomatico	-	-	-	-
YUR25	24	presintomatico	-	-	32,57	84,2
YUR25	25	presintomatico	22,19	82,8	31	84,4
YUR25	26	presintomatico	-	-	-	-
YUR25	27	presintomatico	24,54	82,8	-	-
YUR25	28	presintomatico	-	-	-	-
CASg	29	sintomi medi	-	-	-	-
CASg	30	sintomi medi	-	-	-	-
CASg	31	sintomi medi	-	-	-	-
CASg	32	sintomi medi	-	-	-	-
CASg	33	sintomi medi	-	-	-	-
CASg	34	sintomi medi	23,12	82,8	30,45	84,4

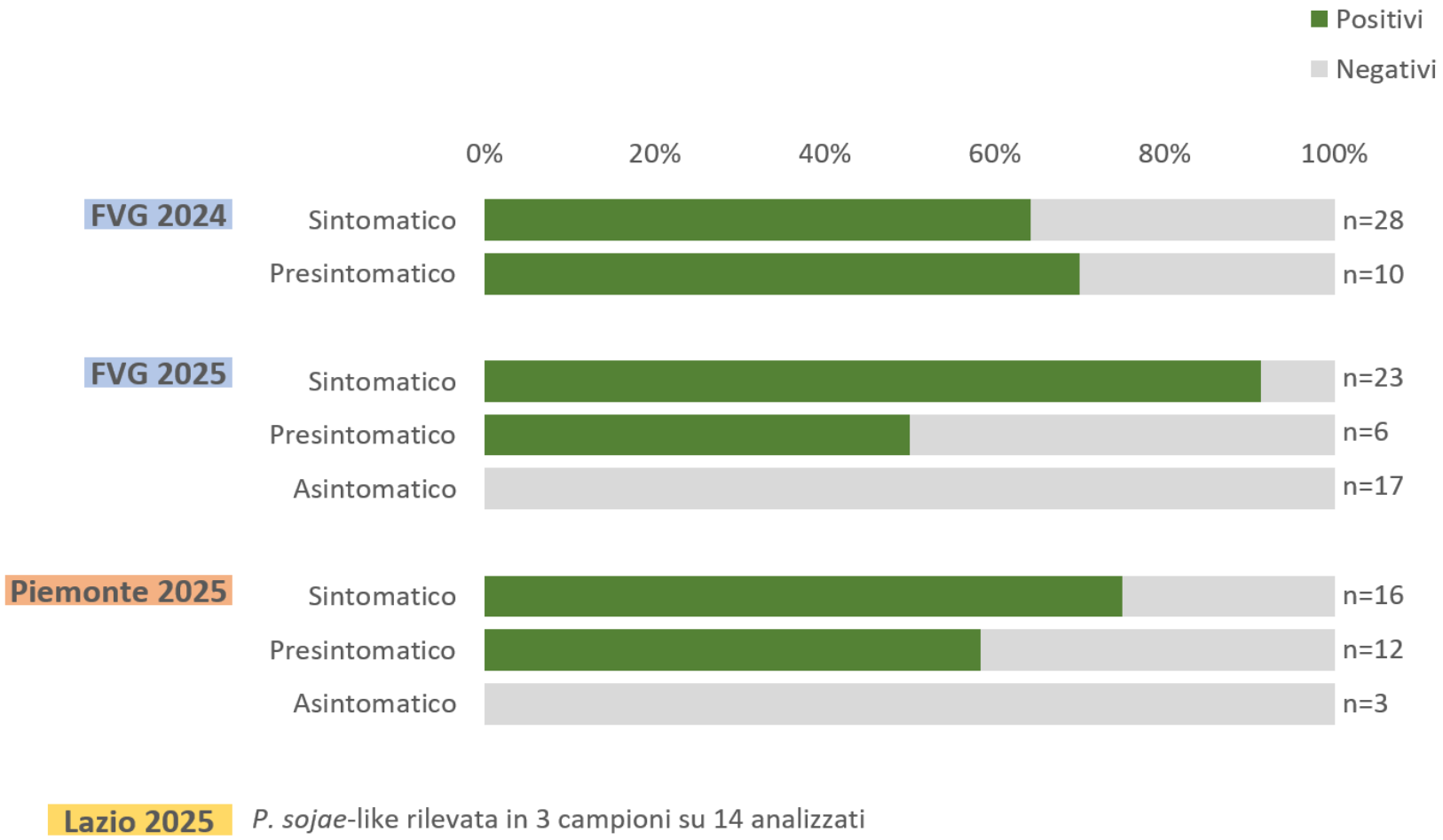
Piemonte 2025

campione	stato	ITS_P.sojae-like_F1/R2		P.soj_YPT1_F2 /R1	
		Cq	T melt	Cq	T melt
255	presintomatico	35,19	83	-	-
257	presintomatico	23,47	83	31,05	84,5
259	presintomatico	19,15	83	27,91	84,5
261	sintomatico	28,71	83	-	-
263	sintomatico	26,45	83	33,89	84,5
265	sintomatico	28,42	83	32,69	84,5
267	presintomatico	-	-	-	-
269	presintomatico	29,92	83	-	-
271	presintomatico	-	-	-	-
273	sintomatico	-	-	-	-
275	sintomatico	33,31	83	-	-
277	sintomatico	30,34	83	-	-
279	presintomatico	-	-	-	-
281	presintomatico	-	-	-	-
283	presintomatico	-	-	-	-
285	sintomatico	-	-	-	-
287	sintomatico	-	-	-	-
289	sintomatico	-	-	-	-
291	asintomatico	-	-	-	-
293	asintomatico	-	-	-	-
295	asintomatico	-	-	-	-
A1	sintomatico	23,78	83	31,56	84,5
A2	sintomatico	22,27	83	31,12	84,5
A3	presintomatico	25,69	83	33,58	84,5
A4	sintomatico	23,17	83	32,12	84,5
A5	presintomatico	28,44	83	-	-
A6	sintomatico	26,41	83	33,45	84,5
A7	sintomatico	25,99	83	33,66	84,5
A8	sintomatico	25,58	83	33,39	84,5
A9	presintomatico	28,25	83	-	-
A10	sintomatico	19,6	83	28,33	84,5

SOS KIWI

DETECTION DI *P. sojae*-like

II parte



Lazio 2025 *P. sojae*-like rilevata in 3 campioni su 14 analizzati

PRESINTOMATICO: pianta **asintomatica** in impianto **sintomatico** (la maggior parte ha mostrato sintomi in seguito)

ASINTOMATICO: pianta **asintomatica** in impianto **asintomatico**

- *P. sojae*-like è stata rilevata in piante sintomatiche e presintomatiche, non in piante asintomatiche
- *P. sojae*-like è stata rilevata in: FVG, Piemonte e Lazio
- Andamento aziendale
  - FVG: positività in 5 aziende su 7 in presenza di sintomi riconducibili a KVDS
  - Piemonte: positività in 3 aziende su 4 in presenza di sintomi riconducibili a KVDS

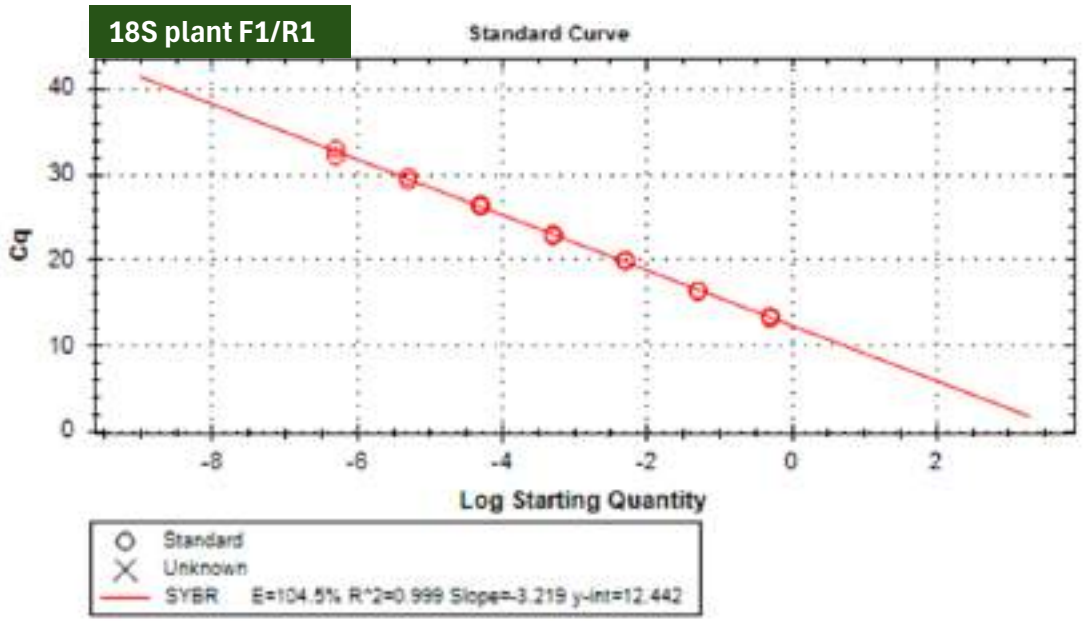
QUANTIFICAZIONE DI *P. sojae*-like (campioni del FVG)

II parte

- Con il saggio basato sulla regione ITS
- Normalizzazione rispetto ai ng di DNA di pianta

$$Q(ng) = 10^{\frac{Cq-b}{m}}$$

$$Ncopie = \frac{massa\ (g)}{lunghezza\ amplicone\ (bp) * 660\ (\frac{g}{mol})} \times N_A$$



Azienda	Campione	Stato	Cq medio *P.sojae*-like	n copie ITS *P.sojae*-like	Cq medio pianta	Q DNA pianta (ng)	n copie/ng DNA pianta
YUR24	Y13	fase prcoce	25,86 ± 0,08	3,62E+02	12,25 ± 0,10	1,147	3,16E+02
YUR24	Y23	fase prcoce	29,75 ± 0,47	2,59E+01	12,89 ± 0,16	0,726	3,57E+01
YUR24	Y8	fase prcoce	32,25 ± 0,06	4,75E+00	12,21 ± 0,18	1,185	4,01E+00
YUR24	Y1	sintomatico	20,55 ± 0,03	1,32E+04	12,74 ± 0,36	0,811	1,63E+04
YUR24	Y2	sintomatico	20,22 ± 0,22	1,66E+04	12,63 ± 0,18	0,877	1,89E+04
YUR24	Y5	sintomatico	20,22 ± 0,05	1,66E+04	13,20 ± 0,05	0,584	2,84E+04
YUR24	Y7	sintomatico	20,50 ± 0,17	1,37E+04	13,03 ± 0,02	0,659	2,07E+04

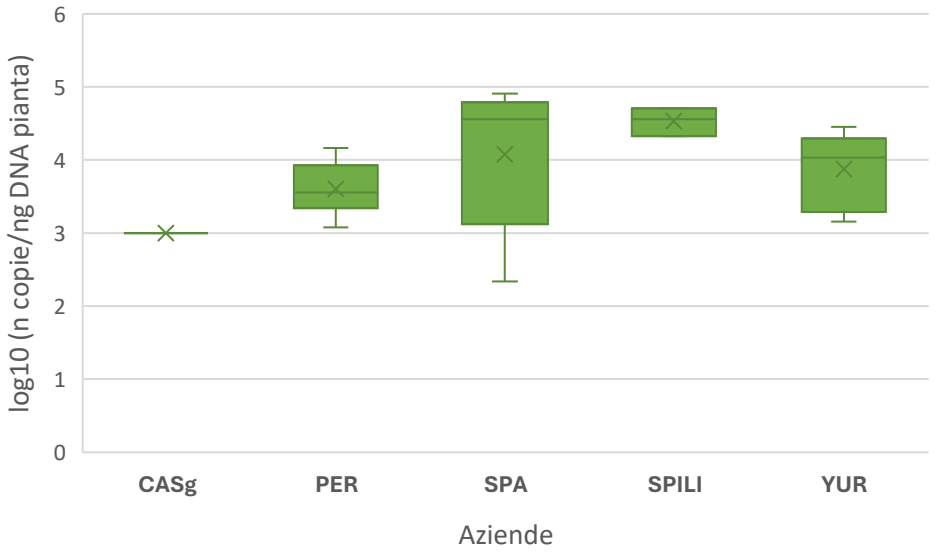
- Range ampio di valori (da 10^0 a 10^4)

SOS KIWI

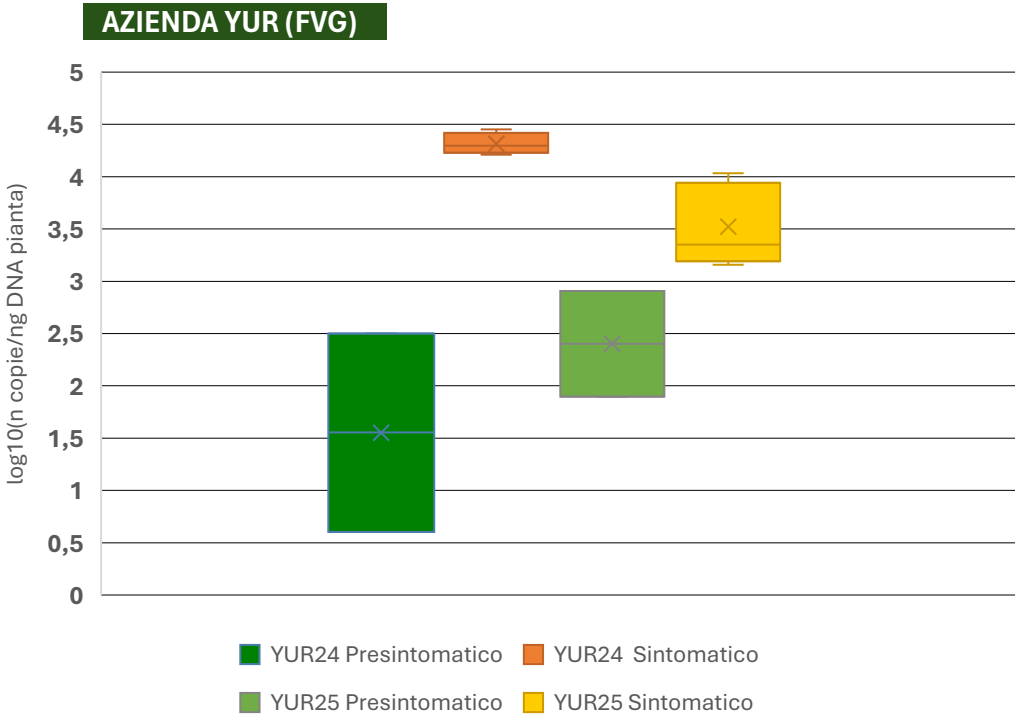
Il parte

QUANTIFICAZIONE DI *P. sojae*-like (campioni del FVG)

- Differenze non significative tra campioni sintomatici di aziende diverse (ANOVA a una via, p = 0,125)



- Differenze tra campioni presintomatici e sintomatici (ANOVA a due vie, p < 0,001)
- L'entità della differenza tra presintomatici e sintomatici è maggiore nel 2024 rispetto al 2025 (ANOVA a due vie, p = 0,024)



SOS KIWI

Il parte

Phytophthora sojae - like

CONCLUSIONE

1

CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE

- *P. sojae*-like: candidata nuova specie
- Inquadramento filogenetico

PROSPETTIVE:
- Implementare la caratterizzazione
- Sequenziare il genoma

2

SAGGI SPECIFICI

- Uno specifico per *P. sojae*-like e uno per gli organismi del sottoclade 7b
- Quantificazione

PROSPETTIVE:
- Ampliare la prova di specificità

3

APPLICAZIONE DEI SAGGI A PIANTE DI *Actinidia*

- Ipotesi sul ruolo di *P. sojae*-like nell'insorgenza della moria

PROSPETTIVE:
- Ampliare il campionamento ad altre zone d'Italia
- Confronto quantitativo con altri potenziali patogeni

GRAZIE PER L'ATTENZIONE



SOS KIWI

Un progetto sostenuto da AGER, coordinato dall'Università degli Studi di Udine,

in collaborazione con:

Università degli Studi di Torino
Università degli Studi Mediterranea di Reggio Calabria
Università degli Studi di Napoli Federico II
Fondazione AGRION